

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003年7月17日 (17.07.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/057888 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/64, C12P 21/00, C12Q 1/02, A61K 48/00, A61P 35/00, 43/00

菅原町 3-1-1004 Osaka (JP). 山村 倫子 (YAMAMURA, Hisako) [JP/JP]; 〒630-0247 奈良県 生駒市 光陽台 151 Nara (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/13683

(74) 代理人: 廣田 雅紀 (HIROTA, Masanori); 〒107-0052 東京都 港区 赤坂二丁目 8 番 5 号若林ビル 3 階 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2002年12月26日 (26.12.2002)

(81) 指定国(国内): CA, US.

(25) 国際出願の言語: 日本語

(84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR).

(26) 国際公開の言語: 日本語

添付公開書類:
— 国際調査報告書(30) 優先権データ:
特願 2001-4021022001年12月28日 (28.12.2001) JP
特願2002-255395 2002年8月30日 (30.08.2002) JP

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市本町四丁目 1 番 8 号 Saitama (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 高橋 克仁 (TAKA-HASHI, Katsuhito) [JP/JP]; 〒563-0055 大阪府 池田市

(54) Title: CELL-SPECIFIC EXPRESSION/REPLICATION VECTOR

(54) 発明の名称: 細胞特異的発現複製ベクター

WO 03/057888 A1 (57) **Abstract:** It is intended to provide a therapeutic method comprising constructing a cell-specific expression/replication vector usable in treating malignant tumor, etc. which is capable of expressing and replicating a gene in specific cells such as a malignant tumor without injuring normal cells (in particular, a vector capable of regulating the expression/replication at a desired point after the expression/replication) and transferring the vector into specific cells such as a malignant tumor *in vivo* followed by the expression thereof. The transcription initiation regulating domain of a human calponin gene which is cell-specifically expressed is acquired and ligated to the upstream of a viral replication-associated gene such as ICP4. Then a DNA encoding a protein such as an angiogenesis regulator or an apoptosis-associated factor is ligated to the viral replication-associated gene as described above via IRES, while a thymidine kinase gene in an intact state is integrated into a viral DNA. Thus a cell-specific expression/replication vector not acting on adult normal cells is constructed. The thus constructed vector is transfected into malignant tumor cells so as to selectively disrupt the malignant tumor cells.

[続葉有]



(57) 要約:

悪性腫瘍等の治療に用いるために、悪性腫瘍等の特定の細胞で特異的に遺伝子を発現しつつ複製し、かつ正常細胞には損傷を与えないような、細胞特異的発現複製ベクター、特にその発現複製後の所望の時期に発現複製を抑制することができるベクターを構築し、悪性腫瘍等の特定の生体細胞に導入し発現させて治療する方法などを提供するものである。細胞特異的に発現するヒトカルポニン遺伝子の転写開始制御領域を取得し、これを I C P 4 等のウイルスの複製関連遺伝子の上流に連結し、前記ウイルスの複製関連遺伝子に I R E S を介して血管新生抑制因子やアポトーシス関連因子等のタンパク質をコードする DNA を連結し、チミジンキナーゼ遺伝子はインタクトな状態で残したものを、ウイルス DNA に組み込んで、成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを構築し、この構築したベクターを悪性腫瘍細胞に感染導入させ、悪性腫瘍細胞を選択的に破壊する。

明細書

細胞特異的発現複製ベクター

5 技術分野

本発明は、特定の細胞に特異的に遺伝子を発現させ自己複製する成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター、特にその発現複製後の所望の時期に発現複製を抑制することができる細胞特異的発現複製ベクター、更には前記ベクターを用いて、特定の生体細胞で遺伝子を発現する方法、あるいは特定の細胞を破壊する方法等に関し、詳しくは、

10 (1) 癌の遺伝子治療分野において、特定の癌細胞そのものあるいは腫瘍内新生血管の増殖平滑筋細胞を特異的に破壊するために、遺伝子の発現を細胞特異的に行い得る発現複製ベクターを作製し、正常細胞には傷害を与えることなく治療を可能とし、治療終了後、ベクター感染細胞を完全に除去することができる安全性の高い細胞特異的発現複製ベクターの構築や、

15 (2) 肺や肝臓などの線維症に対する遺伝子治療の分野において、増殖筋線維芽細胞を特異的に破壊するために、遺伝子の発現を細胞特異的に行い得る発現複製ベクターを作製し、正常細胞には傷害を与えることなく治療を可能とし、治療終了後、ベクター感染細胞を完全に除去することができる安全性の高い細胞特異的発現複製ベクターの構築や、

20 (3) ステント留置後や臓器移植後の血管狭窄や動脈硬化症、糖尿病性網膜症などの遺伝子治療分野において、増殖血管平滑筋細胞を特異的に破壊するために、遺伝子の発現を細胞特異的に行い得る発現複製ベクターを作製し、正常細胞には傷害を与えることなく治療を可能とし、治療終了後、ベクター感染細胞を完全に除去することができる安全性の高い細胞特異的発現複製ベクターの構築や、

25 (4) 糸球体腎炎の遺伝子治療の

分野において、増殖メサンギウム細胞を特異的に破壊するために、遺伝子の発現を細胞特異的に行い得る発現複製ベクターを作製し、正常細胞には傷害を与えることなく治療を可能とし、治療終了後、ベクター感染細胞を完全に除去することができる安全性の高い細胞特異的発現複製ベクターの構築等に関する。

背景技術

正常細胞には影響を与えず、癌細胞のみを選択的に傷害することができる、副作用の少ない理想的な癌の治療法が近年求められている。その一つとして遺伝子治療法が挙げられるが、かかる治療法は癌細胞に導入する遺伝子の細胞選択性や発現プロモーターの活性、ウイルスベクターの感染導入法など、いろいろなレベルで癌細胞選択性を高めることができあり、将来の有望な治療法として注目されている。しかし、すべての癌細胞において治療遺伝子を導入できないという共通の問題がある。

一方、癌の免疫細胞療法も、正常組織にもわずかながら組織特異的分化抗原の発現が認められることから、正常細胞に対する副作用が問題となっている。また、突然変異に基づく癌抗原は、個々の癌にその変異が限られるという欠点をもっていることから、それを分子標的とした癌の免疫細胞療法として一般化するには適しているとはいえない。

最近、感染と複製によって次々と増殖細胞のみを選択的に傷害する複製可能型単純ヘルペスウイルス (HSV) ベクターを用いた悪性脳腫瘍の遺伝子治療臨床研究が米国と英国で行われている (Gene Ther. 7, 859-866, 2000, Gene Ther. 7, 867-874, 2000)。複製可能型HSVベクターは、ウイルス複製に必須な Ribonucleotide reductase (RR) 又は Thymidine kinase (TK) を欠失したベクターであり、これらの酵素は正常細胞では増殖時にのみ発現するが、腫瘍細胞では構成的に発現して

いる。そのため、このHSVベクターは、正常細胞であれ腫瘍細胞であれ増殖の盛んな細胞に感染すると、細胞由来のRRやTKを利用して複製され細胞溶解活性を示す。一方、国内では動物実験で、前立腺癌や肺臓癌に対する複製可能型HSVベクターの抗腫瘍効果が報告されている
5 (J. Surg. Oncol. 72, 136-141, 1999) が、これらも細胞選択性がなく、安全性が低い。従って、血液脳関門があり、循環血液中にベクターが拡散しない脳ではヒトの治療に用いることができたが、脳以外の臓器での治療には適さないという問題点があった。

上記のことから、HSVベクターの傷害活性を標的細胞特異的にコントロールできれば、さらに有効で安全な治療法になると考えられている。
10これまでに、米国のMartuzaらによって、アルブミンプロモーターを用いた肝腫瘍選択性の複製可能型HSVベクターが報告されている (J. Virol. 71, 5124-5132, 1997)。しかし、かかるベクターを用いると肝細胞癌ではアルブミン遺伝子の発現が低下し、また正常な再生肝細胞をも
15傷害することなどからヒトでの臨床応用には適さないと考えられている。その他、米国特許第5728379号明細書 (「腫瘍あるいは細胞特異的単純ヘルペスウイルスの複製」) では、中皮腫に対する応用の可能性を述べているが、平滑筋肉腫や骨肉腫、消化管ストローマ腫瘍 (GIST) などのヒトの肉腫全般、腫瘍血管、増殖性血管病変、増殖性糸球体腎炎、
20肺、肝臓等の線維症あるいは悪性腫瘍の間質で増殖する筋線維芽細胞に対する治療への応用可能性の記述はなされていない。

肉腫の病因と病態に関する遺伝子解析により、一部の腫瘍でp53とRbの変異や融合遺伝子の存在が報告されているが、まだ広く治療に応用できる段階に至ってはいない。ヌードマウスを用いた動物実験で、
25Milasらは複製能を持たないアデノウイルスベクターを用いて平滑筋肉腫細胞にp53遺伝子を導入し、腫瘍の増殖遅延効果があることを報告

している (Cancer Gene Ther. 7, 422-429, 2000)。その他、オステオカルシン遺伝子のプロモーターを用いて、自殺遺伝子であるチミジンキナーゼを骨肉腫に導入発現させる方法が報告されている (Cancer Gene Ther. 5, 274-280, 1998) が、これは複製能を欠失したウイルスベクターを用いたものであり、遺伝子導入の効率が悪く、骨肉腫以外の肉腫には適用できない。特に、Milas らの報告では、本発明者らによる報告 (Cancer Res. 10, 3969-3977, 2001) に記載されているのと同じ、ヒト平滑筋細胞株 SK-LMS-1 を用いた実験例を示しているが、上記報告において使用したウイルスベクターの粒子量の 100 ~ 1000 倍多くのウイルス粒子を使用し、効果は上記報告におけるものよりも劣っている。従って、Milas らの結果は、体内に注入するウイルス粒子の数をできるだけ少なくして副作用を押さえるという観点から、好ましいとは言えない。

また、癌の血管新生抑制療法としては、米国の Folkman のグループによるマウスの実験系で、アンジオスタチンやエンドスタチンなどのペプチド性抑制因子の劇的な抗腫瘍効果が報告されている (Cell 79, 315-328, 15, 1994, Cell 88, 277-285, 1997)。我国においても中村らによって、肝細胞増殖因子の分子内断片である NK_4 の血管新生抑制作用が報告されている (Biochem. Biophys. Res. Commun. 279, 846-852, 2000)。しかしこれらの方法は、大量のペプチドを必要とすること、エンドスタチンに 20 関しては再現性が低いという報告があること、作用メカニズムが不明であること、さらにヒトでの有効性がまだ確認されていないこと、などの問題点がある。現在臨床試験中の血管新生阻害剤は、細胞選択性がなく、阻害効率も低い。米国の Cheresh らが報告した、内皮細胞の表面のインテグリンの作用を阻害するペプチドも同様に細胞選択性がなく、阻害効率が低い (J. Clin. Invest. 103, 1227-1230, 1999)。これらの研究は、すべて血管内皮細胞を標的にした治療であるが、腫瘍血管を構成する増

殖血管平滑筋細胞を標的にした細胞選択性的治療剤は未だ知られていない。実際、平滑筋細胞の増殖と遊走を促進する血小板由来増殖因子受容体の拮抗剤が強力な腫瘍新生血管抑制作用をもつことが報告され (Cancer Res. 60, 4152-4160; 2000)、腫瘍血管新生を抑制するために血管平滑筋を攻撃することの重要性が推測されるが、この方法は細胞非選択性的であり、副作用も予想される。

また、増殖性血管病変特に、ステント留置後や心臓移植後の血管狭窄に対しては、新生内膜の平滑筋増殖を抑制する種々の薬剤が試みられているが、いずれも狭窄の予防には成功していない。最近の遺伝子治療の試みとしては、複製能を欠くアデノウイルスベクターを用いて、カルボニンの相同遺伝子である SM 2 2 α のプロモーターの制御下に L a c Z 遺伝子をバルーン傷害後のラット頸動脈の平滑筋細胞に選択性的に導入した Leiden らの報告がある (J. Clin. Investi. 100, 1006-1014, 1997)。しかし、この実験では L a c Z 遺伝子が導入されたのは、標的細胞である内膜の増殖平滑筋ではなく中膜の平滑筋で、導入効率も極めて低いものであった。また、Nabel らも複製能のないアデノウイルスベクターを用いて SM 2 2 α のプロモーターの制御下に L a c Z 遺伝子を C A T (chloramphenicol acetyltransferase) 遺伝子をブタの動脈に導入する実験を行ったが、内膜の平滑筋細胞の 2. 2 %、中膜平滑筋細胞の 0. 20 5 6 % に遺伝子発現が認められたにすぎなかった (Mol. Med. 6, 983-991, 2000)。一方、複製可能型 H S V ベクターを用いてバルーン傷害後のラット頸動脈に感染させた宮武らの報告 (Stroke 30, 2431-2439, 1999) では、ウイルスの複製は主に内膜の増殖平滑筋で観察され、複製可能型ウイルスベクターを用いることの有用性が推測されるが、このベクターは細胞非選択性的であり、内皮細胞や外膜線維芽細胞の破壊などの副作用も予想される。その他にもデコイやアンチセンス D N A などのオリゴヌク

レオチドを血管に直接導入する方法も発表されているが、導入効率が低く、血管平滑筋増殖の十分な抑制効果は期待できない。

また、増殖性糸球体腎炎に対する最近の遺伝子治療の試みとしては、TGF β 1の阻害作用をもつデコリン(decorin)やTGF β 受容体とIgG Fc領域のキメラ遺伝子、またNFkappaBのデコイをリポソームベクターを用いて腎糸球体に導入する方法が報告されている(Nature Med. 2, 418-423, 1996; Kidney Int. 55, 465-475, 1999; Gene Ther. 7, 1326-1332, 2000)が、この方法は細胞非選択的であり、副作用も予想される。また、腎糸球体に選択的に遺伝子を導入するために、複製能を欠くアデノウイルスベクターをポリスチレンの微小球(microsphere)に結合させてラットの大動脈に投与する方法が発表されている(Kidney Int. 58, 1500-1510, 2000)が、増殖性糸球体腎炎の原因となるメサンギウム細胞以外に血管内皮細胞にも導入遺伝子の発現が認められ、治療の標的化は未だ不完全である。さらに、アデノウイルスは免疫原性が強く、それ自体が糸球体腎炎の原因となる免疫反応を惹起する危険性も指摘されている(Kidney Int. 61, S85-S88, 1997)。

他方、本発明者らは、ヒト由来の肉腫の腫瘍細胞に平滑筋の分化マーカーとされるカルポニン遺伝子が発現していることを見い出し、はじめて報告した(Int. J. Cancer 79, 245-250, 1998, Sarcoma 3, 107-113, 1999, Intern. J. Cancer 82, 678-686, 1999)。その後、骨・軟部肉腫に加えて消化管ストローマ腫瘍(GIST)や唾液腺肉腫、纖維肉腫、悪性神経鞘腫など20種類近い間葉系細胞由来のヒト悪性腫瘍で、カルポニン遺伝子が異常発現していることが国内外で相次いで報告されている。上記カルポニン(h1又はbasic)は、X線結晶構造と、インビトロ及びインビトロの機能解析により、アクチン分子のC末端に結合して、アクチン・ミオシンの滑り運動を抑制することが明らかにされている。

(Biochem. Biophys. Res. Commun. 279, 150-157, 2000, J. Physiol. 529, 811-824, 2000)。カルポニン遺伝子は、成体では、平滑筋細胞に選択的に発現し、血管の分化のマーカーと考えられている (Physiol. Rev. 75, 487-517, 1995)。

5 また、上記米国特許第 5 7 2 8 3 7 9 号明細書や本発明者らによる報告 (Cancer Res. 61, 3969-3977, 2001) においては、HSV のチミジンキナーゼ (Thymidine kinase) をコードする DNA を欠失している複製可能型ベクターについて記述されているが、チミジンキナーゼを欠失している HSV は、抗ヘルペスウイルス薬であるアシクロビル (aciclovir) や
10 ガンシクロビル (ganciclovir) に対する感受性がなく、これらベクターをヒトの治療に応用する場合には、予期せぬウイルス感染の拡大を防ぐ
という安全対策の面において問題がないとはいえた。

その他、神経細胞での複製に関与する gamma 3 4 . 5 遺伝子を 2 コピーとも欠失し、L a c Z 遺伝子が Ribonucleotide reductase (ICP 6) - 1 o c u s に挿入されている複製可能型 HSV - 1 ベクター G 2 0 7 (Nature Med. 1, 938-943, 1995) や、CMV プロモーター／エンハンサーによって発現する autofluorescent protein と cytosine deaminase を ICP 6 - 1 o c u s に相同組換え法で挿入した複製可能型 HSV - 1 ベクター HSV 1 y CD (Cancer Res. 61, 5447-5452, 2001) は知ら
20 れていたが、ともに Ribonucleotide reductase が欠失する結果、増殖細胞でのみ複製可能であるが、細胞選択性をもたない。また、肺や肝臓などの線維症における増殖筋線維芽細胞を標的にして、選択的に破壊する治療法の報告はない。また、悪性腫瘍の間質で増殖する筋線維芽細胞を標的にした治療法もこれまで報告がない。

25 本発明の課題は、悪性腫瘍等の治療に用いるために、悪性腫瘍等の特定の細胞で特異的に遺伝子を発現しつつ複製し、かつ正常細胞には損傷

を与えないような、細胞特異的発現複製ベクター、特にその発現複製後の所望の時期に発現複製を抑制することができる細胞特異的発現複製ベクターを構築すること、更には、該ベクターを悪性腫瘍等の特定の生体細胞に導入し発現させて治療する方法などを提供することにある。

5 本発明者らは、上記課題を解決するために銳意研究し、特定の腫瘍細胞や平滑筋細胞に特異的に発現するヒトカルポニン遺伝子の該細胞内における転写開始制御領域を取得し、ウイルス複製関連遺伝子の複製開始に必要な転写因子をコードする遺伝子の上流に組み込んで、これをウイルスDNAの複製に必須の酵素であるTK遺伝子と置き換えることによ
10 って、悪性腫瘍細胞や腫瘍内新生血管の増殖平滑筋細胞等の特定の細胞で該遺伝子を発現させ、ウイルス複製を誘導し得る成人正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを構築した。この構築した細胞特異的発現複製ベクターを悪性腫瘍組織に導入したところ、腫瘍細胞や腫瘍新生血管の増殖平滑筋を選択的に傷害することを報告している (Cancer
15 Res. 61, 3969-3977, 2001; 特願2001-143999)。

上記本発明者らが報告したカルポニンプロモーターをもつ複製可能型HSV-1ベクター (Cancer Res. 61, 3969-3977, 2001; 特願2001-143999) や、前記米国のMartuzaらによる、アルブミンプロモーターを用いた肝腫瘍選択的な複製可能型HSV-1ベクター (J. Virol. 71, 5124-5132, 1997; 米国特許5728379) が、これまでに発表された細胞特異的に複製可能なHSV-1ベクターであるが、どちらもウイルス複製に必須の転写因子であるICP4をコードする遺伝子を2つとも欠失したHSV-1変異体ウイルスd120を親株とし、プロモーターの上流にLacZcDNAを、下流にICP4cDNAを接続し、d120のチミジンキナーゼ (Thymidine kinase) 遺伝子座 (TK-locus) に相同組み換えしたものである。したがって、ベクタ
25

一精製の過程で指標となる L a c Z 遺伝子の発現は T K 遺伝子のプロモーターの制御下にある。

かかるチミジンキナーゼをコードする D N A を欠失している複製可能型 H S V - 1 ベクターは、抗ヘルペスウイルス薬であるアシクロビル 5 (aciclovir) やガンシクロビル (ganciclovir) に対する感受性が欠如している。したがって、ベクターを單一クローニングにまで精製する方法は、相同組み換え後のウイルス混合液を I C P 4 c D N A を導入した V e r o E 5 細胞に感染させ、5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリル - β - D - ガラクトピラノシド (X - g a l) アガロースオーバーレイ法で 10 L a c Z 遺伝子の発現を示す青色の染色によって、複数、好ましくは少數のプラークを回収し、ガンシクロビル (ganciclovir) の存在下で V e r o E 5 細胞に再び感染させるというプラーク精製のサイクルを繰り返すことによって行われてきた。抗ヘルペスウイルス薬によって T K - 1 o c u s で組み換えが起こらなかったウイルスすなわち T K 遺伝子をも 15 つウイルスを排除するこの方法は、当然のことながら T K 遺伝子をもつ細胞特異的発現複製ベクターの精製には適用することができない。

また、X - g a l アガロースオーバーレイ法は、スクリーニングの初期段階では單一のプラークを回収することは不可能である。さらに、この方法ではアガロースをオーバーレイした時点で、細胞の分裂増殖が停止するとともにウイルスの複製も停止する結果、それ以降はウイルス粒子の数が増加しない。この場合、リボヌクレオチド還元酵素 (Ribonucleotide reductase, R R) 遺伝子のプロモーターなど T K 遺伝子のプロモーターより活性の強いプロモーターによって発現される L a c Z 遺伝子をもつ複製可能型ベクターでは、ベクター自身の複製能が 20 高くない場合、T K 遺伝子のプロモーターによって発現される L a c Z 遺伝子をもつ複製可能型ベクターのものと同程度に青色に染色された細 25

胞1個あたりのウイルス数が少ない。そのため、次のスクリーニングに向けて複製能力のあるベクターを回収することが困難である。

さらに、細胞特異的発現複製ベクターとして、ICP4cDNAとIRES (internal ribosomal entry site) の下流に挿入した任意の遺伝子（蛍光を発する Green Fluorescent Protein を発現する cDNA を好適に例示することができる）を連結させると、上記任意の遺伝子を細胞特異的な転写開始制御領域の制御下に発現させ、この任意の遺伝子の発現と LacZ 遺伝子の発現の両方を指標にしてスクリーニングすることが可能となり、目的の場所に相同組み換えが起こったウイルスベクターをより確実にしかも迅速に単離することができるとの知見を得た。

また、相同組み換え後の最初のスクリーニングに、細胞特異的に発現する遺伝子のプロモーターすなわち転写開始制御領域が活性化され得る ICP4 (-) 細胞又は該遺伝子を発現する ICP4 (-) 細胞に、細胞特異的発現複製ベクターを含む相同組み換え後のウイルス混合液を感染させ、前記ウイルスを複製・増殖させた後、ベクター内に組み込んだ遺伝子の発現を指標にして、限界希釈法によって单一クローンにまで精製することによって、細胞特異的プロモーターの制御下に ICP4 を発現するという目的の組み換えが起こったベクターを選別濃縮することができることを見い出した。さらに、チミジンキナーゼを温存した細胞特異的発現複製ベクターは、アシクロビル (acyclovir) やガンシクロビル (ganciclovir) によってその感染細胞とともにウイルスを死滅させることができあり、予期せぬウイルス感染の拡大を防ぐという安全対策の面で優れた特性を有しているとの知見を得た。一方、チミジンキナーゼを欠失することを特徴とする細胞特異的複製可能型 HSV-1 ベクターである米国特許 5 7 2 8 3 7 9 号の発明および先に出願した特願 2 0 0 1 - 1 4 3 9 9 9 号の発明の実施例は、ヒトの治療への応

用には適さないとも考えられる。そして、細胞特異的発現複製ベクターが、実際にヒト軟部肉腫の中で最も頻度の高い悪性線維性組織球種 (Malignant Fibrous Histiocytoma; M F H) や、ヒト消化管肉腫の中で最も頻度の高い消化管ストローマ腫瘍 (Gastrointestinal stromal tumor; G I S T) や、婦人科領域で最も頻度の高い子宮筋腫に対して治療効果をもつことをインビトロの細胞培養系または動物実験系で確認した。本発明は上記の知見に基づいて完成するに至ったものである。

発明の開示

10 すなわち本発明は、細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域を所定の遺伝子の上流に組み込んだ成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターにおいて、前記細胞特異的発現複製ベクターに存在するチミジンキナーゼ (Thymidine kinase) 遺伝子を利用して所望の時期にその複製を抑制しうることを特徴とする成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター (請求項 1) や、細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域が、配列番号 1 に示される塩基配列を含む領域であることを特徴とする請求項 1 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター (請求項 2) や、配列番号 1 に示される塩基配列を含む領域が、配列番号 2 に示される塩基配列からなるヒトカルボニン遺伝子プロモーターを含む領域であることを特徴とする請求項 2 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター (請求項 3) や、配列番号 2 に示される塩基配列を含む領域が、配列番号 3 に示される塩基配列を含む領域であることを特徴とする請求項 3 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター (請求項 4) や、細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域が、配列番号 1、配列番号 2 又は配列番号 3 に示される塩基配列において、1 若しくは数個の塩基が

欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ転写開始制御活性を有する塩基配列を含む領域であることを特徴とする請求項1記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項5）や、転写開始制御領域の上流にエンハンサーが組み込まれていることを特徴
5 とする請求項1～5のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項6）や、エンハンサーが4F2エンハンサーであることを特徴する請求項6記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項7）や、所定の遺伝子のさらに下流に、所定の遺伝子とは異なる目的タンパク質をコードするDNAが連結
10 され、前記転写開始制御領域の制御下に目的タンパク質を発現することを特徴とする請求項1～7のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項8）や、目的タンパク質をコードするDNAが、IRES (internal ribosomal entry site)を介して所定の遺伝子に連結されていることを特徴する請求項8記載の成体正常細胞
15 に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項9）や、目的タンパク質をコードするDNAが、アポトーシスの促進に関連する遺伝子であることを特徴とする請求項1～9のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項10）や、目的タンパク質をコードするDNAが、血管新生抑制作用をもつタンパク質をコードするDNAであることを特徴とする請求項1～9のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項11）や、目的タンパク質をコードするDNAが、癌転移抑制作用をもつタンパク質をコードするDNAであることを特徴とする請求項1～9のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項12）や、目的タンパク質をコードするDNAが、癌抑制作用をもつタンパク質をコードするDNAであることを特徴とする請求項1～9のいず

れか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 13）や、所定の遺伝子が、ウイルス複製関連遺伝子であることを特徴する請求項 1～13のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 14）や、ウイルス複製関連遺伝子 5 が、ICP4 又は E1A であることを特徴する請求項 14 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 15）や、発現複製ベクターが、ウイルスベクターであることを特徴とする請求項 1～15 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 16）や、ウイルスベクターが、単純ヘルペスウイル 10 スベクター（HSVベクター）又はアデノウイルスベクターであることを特徴とする請求項 16 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 17）や、腫瘍細胞特異的、腫瘍新生血管の増殖平滑筋特異的、増殖性血管病変における増殖平滑筋特異的、糸球体腎炎における増殖メサンギウム細胞特異的、又は線維症における増殖筋線 15 維芽細胞特異的な発現複製ベクターであることを特徴とする請求項 1～15 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 18）や、リボヌクレオチドリダクターゼ(Ribonucleotide reductase)をコードするDNAをコードするDNAを欠失していることを特徴とする請求項 1～18 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 19）に関する。

また本発明は、請求項 1～19 のいずれかに記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、生体細胞組織に導入し、発現複製させることを特徴とする成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの遺伝子、タンパク質又はペプチドの発現複製方法（請求項 20）や、請求項 1～19 のいずれかに記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、生体細胞組織に導入し、発現複製 25

させ、その後の所望の時期に、細胞特異的発現複製ベクターの発現複製を抑制することを特徴とする成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの遺伝子、タンパク質又はペプチドの発現複製・抑制方法（請求項 21）や、細胞特異的発現複製ベクターの発現複製の抑制が、
5 アシクロビル (aciclovir)、ガンシクロビル (ganciclovir) 等の抗ウイルス薬を用いることによる抑制であることを特徴とする請求項 21 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの遺伝子、タンパク質又はペプチドの発現複製・抑制方法（請求項 22）や、請求項 1～19 のいずれかに記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、生体細胞組織に導入し、発現複製させて前記細胞特異的発現複製ベクターによるチミジンキナーゼ活性を測定することを特徴とする成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの生体内分布を検出する方法（請求項 23）や、チミジンキナーゼ活性の測定が、
10 124 I でラベルしたウラシル誘導体 FIAU を用いる Positron Emission Tomography による測定であることを特徴とする請求項 23 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの生体内分布を検出する方法（請求項 24）に関する。
15

さらに本発明は、生体細胞組織が、腫瘍組織、動脈狭窄組織、腎炎組織又は線維症組織であることを特徴とする請求項 20～24 のいずれか記載の方法（請求項 25）や、請求項 1～19 のいずれかに記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを含むことを特徴とする治療薬（請求項 26）や、悪性腫瘍、線維症、増殖性血管病変又は増殖性糸球体腎炎に対する治療薬であることを特徴とする請求項 26 記載の治療薬（請求項 27）や、悪性線維性組織球種、消化管ストローマ腫瘍又は子宮筋腫に対する治療薬であることを特徴とする請求項 27 記載の治療薬（請求項 28）や、請求項 1～19 のいずれか記載の成体正

常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、肺、肝臓などの線維症組織または乳がん、胃がん、膵臓がんなどの悪性腫瘍組織に導入し、遺伝子、蛋白およびペプチドを発現させ、増殖筋線維芽細胞を選択的に破壊することを特徴とする線維症及び悪性腫瘍の治療方法(請求項 29)
5 や、悪性線維性組織球種、消化管ストローマ腫瘍又は子宮筋腫を対象とすることを特徴とする請求項 29 記載の線維症及び悪性腫瘍の治療方法(請求項 30) や、請求項 1～19 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、血管狭窄組織または動脈硬化組織、糖尿病性網膜症組織に導入し、遺伝子、タンパク質又はペプチド
10 を発現させ、増殖平滑筋細胞又は血管周細胞を選択的に破壊することを特徴とする増殖性血管病変の治療方法(請求項 31) や、請求項 1～19 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、腎炎組織に導入し、遺伝子、タンパク質又はペプチドを発現させ、増殖メサンギウム細胞を選択的に破壊することを特徴とする増殖性
15 糸球体腎炎の治療方法(請求項 32) や、細胞特異的発現複製ベクターを、静脈又は動脈に投与することを特徴とする請求項 29～32 のいずれか記載の治療方法(請求項 33) や、所望の時期に、細胞特異的発現複製ベクターの発現複製を抑制することを特徴とする請求項 29～33
のいずれか記載の治療方法(請求項 34) や、細胞特異的に発現する遺
20 伝子の転写開始制御領域が活性化され得る細胞又は該遺伝子を発現する細胞に、請求項 1～19 のいずれか記載の細胞特異的発現複製ベクターを含む相同組み換え後のウイルス混合液を感染させ、ベクター内に組み込んだ遺伝子の発現を指標にして、限界希釈法によって单一クローンにまで精製することを特徴とする細胞特異的発現複製ベクターの製造方法
25 (請求項 35) や、細胞が、ICP4 (-) 細胞であることを特徴とする請求項 35 記載の細胞特異的発現複製ベクターの製造方法(請求項 3

6) に関する。

図面の簡単な説明

第1図は、d12・CALPΔRR作成の手順とその構造を示す写真である。左は、pKpX2 (ICP6のXhoI断片) と ICP6のStuI-XhoI断片を DIG 標識プローブにしたサザンプロットの結果を示す。d120は相同組み換えを行った親株で、2つのICP4遺伝子をともに欠失したKOS株由来の変異体である。hrr3は、野性型であるKOS株のRibonucleotide reductase (ICP6) 遺伝子のBamHIサイトにLacZ遺伝子が挿入され (pKX2βG3)、結果としてICP6を欠失している。

第2図は、インビトロでのカルポニン陽性悪性腫瘍細胞 (SK-LM S-1平滑筋肉腫) に対するd12・CALPΔRRの選択的細胞傷害活性を示す写真である。左上は、RT-PCRでカルポニンmRNAの発現をみたもので、OST骨肉腫細胞では、カルポニンはほとんど発現していない。右はブラークのX-Gal染色である。

第3図は、インビトロでのカルポニン陽性悪性腫瘍細胞 (SK-LM S-1平滑筋肉腫) におけるd12・CALPΔRRの複製を LacZ 遺伝子の発現を示すX-Gal染色で示し、カルポニンプロモーターの制御下に発現するEGFP蛋白を蛍光顕微鏡で観察した写真である。LacZとEGFPが共に発現している細胞を多数観察することができる。

第4図は、インビトロでのカルポニン陽性悪性腫瘍細胞 (SK-LM S-1平滑筋肉腫) およびICP4cDNAを導入したVeroE6細胞におけるd12・CALPΔRRの複製と細胞傷害活性のガニシクロビル (ganciclovir) 感受性を示す写真である。左はガニシクロビル (ganciclovir) 高感受性のhrr3と比較したものであり、右は、チミジ

ンキナーゼを欠失する d 1 2 · C A L P (特願 2 0 0 1 - 1 4 3 9 9 9) と比較したもので、1 μ g / m l のガンシクロビル (ganciclovir) 存在下で細胞傷害活性をみたものである。d 1 2 · C A L P はガンシクロビル (ganciclovir) に感受性がない。

5 第 5 図は、カルポニン m R N A の発現及びインビトロでの細胞崩壊分析及びベクター複製分析を示す写真である。a は、ヒト肉腫 (悪性線維性組織球腫) におけるカルポニン (h 1) m R N A の発現を示す。b は、腫瘍に対して d 1 2 · C A L P \triangle R R ベクター 0 . 0 1 M O I を感染させたときのプラークの X - G a 1 染色である。

10 第 6 図は、インビトロでの細胞崩壊分析及びベクター複製分析を示す写真である。a は G I S T 細胞に対して 0 . 0 1 M O I の、b は、G I S T 細胞に対して 0 . 1 M O I の、c は、子宮筋腫培養細胞に対して 0 . 0 1 M O I の、d は、子宮筋腫培養細胞に対して 0 . 1 M O I の、d 1 2 · C A L P \triangle R R ベクターをそれぞれ感染させたときのプラークの X - G a 1 染色である。

15 第 7 図は、インビボでの皮下腫瘍に対する抗腫瘍効果を示すグラフである。

20 第 8 図は、インビボでの肺転移腫瘍における d 1 2 · C A L P \triangle R R ベクターの 1 回静脈内投与における複製の分析及び抗腫瘍効果を示す写真である。

第 9 図は、インビボでの d 1 2 · C A L P \triangle R R ベクターの 3 回静脈内投与によるヒト肺転移腫瘍の治療効果を示す写真である。

発明を実施するための最良の形態

25 本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターとしては、細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域を所定の遺伝子

の上流に組み込んだ成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターにおいて、前記細胞特異的発現複製ベクターに存在するチミジンキナーゼ (Thymidine kinase) 遺伝子を利用して所望の時期にその複製を抑制しうるベクターであれば特に制限されるものではないが、腫瘍細胞
5 特異的、腫瘍新生血管の増殖平滑筋特異的、増殖性血管病変における増殖平滑筋特異的、糸球体腎炎における増殖メサンギウム細胞特異的、又は線維症における増殖筋線維芽細胞特異的な発現複製ベクターが好ましく、上記細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域としては、細胞特異的に発現している遺伝子のプロモーター領域や該プロモーターの
10 一部の領域を挙げることができ、より具体的には、カルポニン遺伝子のプロモーターの -260 から -219 までの配列番号 1 に示される塩基配列を含む領域、好ましくは配列番号 2 に示される塩基配列からなるヒトカルポニン遺伝子プロモーター、より好ましくは配列番号 3 に示される塩基配列からなるヒトカルポニン遺伝子プロモーターとその構造遺伝
15 子の一部を含む領域を例示することができる。また、細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域として、上記配列番号 1 、配列番号 2 又は配列番号 3 に示される塩基配列において、1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ転写開始制御活性を有する塩基配列、例えばマウス、ラット及びブタ由来のカルポニンプロモーターのそれに相同な領域を含む領域を例示することができる。
20

上記の他、細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域として、増殖平滑筋細胞を攻撃の標的にする場合は、SM22 α 遺伝子のプロモーター領域 (ヒト SM22 α 遺伝子では -480 から -26 までの配列 ; GenBank accession# D84342-D84344 、マウスやラットあるいはその他の哺乳動物由来の SM22 α 遺伝子ではそれに相同な領域) 、内皮細胞を標的にする場合は、F1k-1 のプロモーター領域又は F1t-1 遺伝

子など内皮細胞特異的遺伝子のプロモーター領域を用いることができる。これらの場合にも、一部構造遺伝子を含む領域を転写開始制御領域とすることもできる。

上記細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域の上流に、転写を著しく活性化するエンハンサーを連結することが好ましく、かかるエンハンサーとしてはアデノウイルス初期遺伝子のエンハンサー、モロニーマウス白血病ウイルス末端反復配列のエンハンサー、ヒストンH2A遺伝子エンハンサー、免疫グロブリンエンハンサー、インスリン遺伝子エンハンサー、c-fos遺伝子エンハンサー、T細胞抗原受容体遺伝子エンハンサー、筋型クリアチンキナーゼ遺伝子エンハンサー、ヒト4F2重鎖（ヘビーチェイン）転写エンハンサー等のエンハンサーであれば特に制限されないが、細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域が、カルポニン遺伝子のプロモーターの-260から+73までの配列を含む領域の場合、アミノ酸トランスポーターの活性化因子であると考えられている膜貫通構造を一回しか持たない二型膜糖タンパク質である4F2ヘビーチェイン遺伝子のエンハンサーであるヒト4F2重鎖転写エンハンサー（配列番号4）等の4F2エンハンサーが転写効率を著しく高めうる点で好ましい。

本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの作製に用いられる所定の遺伝子としては、ウイルスの複製の開始又は維持に必要な遺伝子であれば特に制限されるものではなく、例えば、アデノウイルスのE1A遺伝子、ICP6 (Ribonucleotide reductase) 遺伝子などのウイルス複製関連遺伝子を挙げることができ、中でもヘルペスウイルスの複製開始に必要な転写因子をコードする遺伝子 (ICP4) を好適に例示することができる。また、これら遺伝子は、転写開始制御領域の下流に位置する本来の構造遺伝子の一部又は全部と上記所定の遺

伝子がインフレームで結合したものでもよく、例えば、カルポニン蛋白質のN末端側の一部とICP4蛋白質との融合タンパク質をコードするDNAを具体的に挙げることができる。

本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターとして、所定の遺伝子のさらに下流に、所定の遺伝子とは異なる目的タンパク質をコードするDNAが連結され、前記転写開始制御領域の制御下に目的タンパク質を発現することができる細胞特異的発現複製ベクター、具体的には、上記目的タンパク質をコードするDNAが、IRES (internal ribosomal entry site; 米国特許第4937190号明細書) 5 を介して所定の遺伝子に連結されている細胞特異的発現複製ベクターを好適に挙げができる。このIRES部分にカルポニンのホモログであるSM22 α 遺伝子のプロモーターを連結することもできる。かかるヒトSM22 α プロモーター配列は本発明者らが最初にクローニングし、報告しており (J. Biochem. (Tokyo) 122, 157-167, 1997)、プロモーター活性に重要な部分 (ヒトSM22 α プロモーター領域のBamH 10 I - Dra I 断片445bp) の塩基配列を配列番号5としてしめす。その他、IRESに代えて、CMVプロモーターやCAGプロモーター 15 エンハンサーを用いると、カルポニンのプロモーターの制御から外れ、細胞非選択的に下流の目的タンパク質をコードする遺伝子を発現させることができる。

上記目的タンパク質をコードするDNAとしては、アポトーシスの促進に関連する遺伝子や、血管新生抑制作用をもつタンパク質をコードするDNAや、癌転移抑制作用をもつタンパク質をコードするDNAや、癌抑制作用をもつタンパク質をコードするDNA等を挙げることができ、 20 これらは2以上連結してもよい。上記アポトーシスの促進に関連する遺伝子としては、Bcl-1-xs, Bok/Mtd, Bcl-1-Gs/Bra, 25

B c l - G L 、 B c l - R a m b o 、 H r k / D P 5 、 B i k / N b k / B l k 、 B a d 、 B i d 、 B i m L 、 S 、 E L / B o d L 、 M 、 S 、 N o x a / A P R 、 P u m a 等のアポトーシス促進遺伝子を、血管新生抑制作用をもつタンパク質をコードするDNAとしては、アンジオスタチン、エンドスタチン、可溶性 F l k - 1 、可溶性 F l t - 1 、可溶性 F L T 4 、 T i e 1 、 T i e 2 などのドミナントネガティブ受容体タンパク質をコードするDNAを、癌転移抑制作用をもつタンパク質をコードするDNAとしては、マトリックスメタロプロテアーゼ (M M P) 阻害剤、ウシラクトフェリン (b L F) などのタンパク質をコードするDNAを、癌抑制作用をもつタンパク質をコードするDNAとしては、p 2 1 、 p 1 6 、 p 1 5 等の細胞周期抑制物質や、p 5 3 、 R b 、 I R F - 1 、 A P C 等の細胞増殖抑制物質をコードするDNAを、それぞれ具体的に例示することができるがこれらに限定されるものではない。

上記目的タンパク質をコードするDNAとして、E G F P c D N A や、ルシフェラーゼ (Luciferase) 遺伝子等のマーカータンパク質をコードする遺伝子を挙げることができ、これらマーカータンパク質を発現することができる細胞特異的発現複製ベクターは、スクリーニングや各種実験等においてきわめて有用である。

本発明の成体では正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの作製に用いられるウイルスベクターの骨格としては、骨・軟部肉腫、平滑筋肉腫、消化管ストローマ腫瘍 (G I S T) 、悪性中皮腫、悪性纖維性組織球腫 (M F H) 、纖維肉腫、悪性髄膜腫、子宮筋腫、神経鞘腫等の腫瘍細胞又は腫瘍新生血管の増殖平滑筋あるいは血管周細胞に感染又は遺伝子を導入し発現することができるベクターが好ましく、かかるベクターとしては、染色体、エピソーム、リポソーム及びウイルスに由来する発現ベクターを例示することができるが、S V 4 0 のようなパボバウ

イルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスベクター、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レトロウイルス由来のベクター、単純ヘルペスウイルスベクター（HSVベクター）等のウイルスベクターが好ましく、中でも、HSVベクターとアデノウイルスベクター、特に条件付き複製可能型HSVベクター、又は条件付き複製可能型アデノウイルスベクターが、遺伝子発現の高効率性、増殖細胞特異的細胞傷害活性などの点で好ましい。上記条件付き複製可能型HSVベクターとして、例えば、リボヌクレオチドリダクターゼ（Ribonucleotide reductase）をコードするDNAが欠失しているベクターを用いることにより、本発明の成体正常細胞に作用せず、ベクターの複製と遺伝子の発現を制御できる細胞特異的発現複製ベクターを好適に作製することができる。

本発明の成体では正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの発現複製方法としては、前記の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、生体細胞組織、好ましくは骨・軟部肉腫、平滑筋肉腫、消化管ストローマ腫瘍、悪性中皮腫、悪性纖維性組織球腫、纖維肉腫、悪性髄膜腫、神経鞘腫等の腫瘍が生じている組織の他、ステント留置後や臓器移植後の血管狭窄組織若しくは動脈狭窄組織、腎炎組織又は線維症組織、又はこれら組織を含む器官に直接導入又は腫瘍を養う血管系から注入、又は血管内にステント等を用いて直接注入し発現複製させる方法、又は腫瘍新生血管の増殖平滑筋を攻撃の標的とする場合は、悪性固形腫瘍の種類がいかなるものであれ、直接導入又は腫瘍を養う血管系から注入し、発現複製させる方法であれば、特に制限されるものでない。また、本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの遺伝子、タンパク質又はペプチドの発現複製・抑制方法としては、前記の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、

上記生体細胞組織に導入して発現複製させ、その後の所望の時期に、例えれば、アシクロビル (aciclovir)、ガンシクロビル (ganciclovir) 等の抗ウイルス薬を用いて、細胞特異的発現複製ベクターの発現複製を抑制する方法であれば、特に制限されるものでない。そしてまた、本発明の治療薬としては、前記本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを有効成分として含むものであればどのようなものでもよく、かかる治療薬としては生体細胞組織、好ましくは上記悪性腫瘍、線維症、増殖性血管病変、増殖性糸球体腎炎等に対する治療薬を具体的に例示することができる。

本発明の線維症及び悪性腫瘍の治疗方法としては、前記本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、肺、肝臓などの線維症組織又は乳がん、胃がん、膵臓がんなどの悪性腫瘍組織に導入し、遺伝子、タンパク質又はペプチドを発現させる方法であれば特に制限されず、なかでも、増殖筋線維芽細胞だけを選択的に破壊する方法や、腫瘍新生血管の増殖平滑筋又は血管周細胞だけを選択的に破壊する方法が好ましい。悪性腫瘍が生じている組織に導入する方法としては、悪性腫瘍に上記細胞特異的発現複製ベクターを直接注入する方法又は動静脈投与等の腫瘍を灌流する血管系に注入する方法を好適に例示することができる。本発明の増殖性血管病変の治疗方法としては、前記本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、血管狭窄組織又は動脈硬化組織、糖尿病性網膜症組織に導入し、遺伝子、タンパク質又はペプチドを発現させる方法であれば特に制限されず、なかでも、増殖平滑筋細胞又は血管周細胞だけを選択的に破壊する方法を好適に例示することができる。また、本発明の増殖性糸球体腎炎の治疗方法としては、前記本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、腎炎組織に導入し、遺伝子、タンパク質又はペプチドを発現させる方法

であれば特に制限されず、なかでも、増殖メサンギウム細胞だけを選択的に破壊する方法を好適に例示することができる。そして、本発明の上記治療方法においては、細胞特異的発現複製ベクターの発現複製を、治療終了後等の所望の時期に、抑制することを大きな特徴としている。

5 本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの生体内分布を検出する方法としては、前記本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、生体細胞組織に導入し、発現複製させて前記細胞特異的発現複製ベクターによるチミジンキナーゼ活性を検出・測定することを特徴とし、具体的には、¹²⁴Iでラベルしたウラ
10 シル誘導体 FIAU を生体に投与し、Positron Emission Tomography により¹²⁴Iを検出・測定することにより、細胞特異的発現複製ベクターの生体内分布を検出することができる (Nature Med. 7, 859-863, 2001)。

本発明の細胞特異的発現複製ベクターの製造方法としては、細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域が活性化され得る細胞又は該遺
15 伝子を発現する細胞、好ましくは ICP4 (-) 細胞に、前記本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを含む相同組み換え後のウイルス混合液を感染させ、ベクター内に組み込んだ遺伝子の発現を指標にして、限界希釈法によって単一クローンにまで精製するスクリーニング方法であれば特に制限されるものではなく、かかるスクリ
20 ーニングによる本発明の細胞特異的発現複製ベクターの製造方法の確立により、前記本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターをはじめて得ることができる。

以下に、実施例を揚げてこの発明を更に具体的に説明するが、この発明の範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

25 実施例 A [方法と材料]

A-1 (細胞、培養方法、抗体、及びウイルス)

ヒト平滑筋肉腫細胞株SK-LMS-1 (HTB-88)、及びベロ細胞 (CCL-81) は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culuture Collection) から購入した。ヒト骨肉腫細胞株OST (RCB0454) は、理研ジーンバンク (RIKEN GENE BANK) 5 から購入した。ICP4 遺伝子を導入したベロ細胞、E5 細胞は、N. Deluca (University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh) から供与されたものを用いた。ヒト悪性線維性組織球種細胞株 (MFH-AI) は、神奈川県立がんセンターの矢野間博士より供与されたものを用いた。ヒト消化管ストローマ腫瘍 (GIST) 細胞とヒト子宮筋腫細胞は、カルポニン蛋白を発現していることを免疫組織化学によって確認した手術標本から腫瘍塊を無菌的に摘出し、コラゲナーゼ (1 mg/m1 ; Sigma Cat. # C-9722) 溶液で処理し、初代培養細胞を分離し、ベクターの感染実験にはRPMI 1640 培地で3~4世代継代培養したもの用いた。SK-LMS-1 は1 mM のピルビン酸ナトリウムを添加したイーグルMEMで培養した。OST、ベロ及びE5 細胞は、D MEMで培養した。MFH-AI はRPMI 1640 培地で培養した。全ての培地には、最終濃度で10% の熱不活性化ウシ胎仔血清 (Upstate Biotechnologies)、2 mM のL-グルタミン、100 unit/mL のペニシリン、及び100 µg/mL のストレプトマイシンがそれぞれ含まれている。また、上記全ての細胞は、加湿された5% のCO₂条件下で37°Cにて培養した。

上記MFH-AI 細胞を、6週齢の雌の無胸腺症ヌードマウス (BALB/c Slc-nu/nu) (日本SLC社製) の体側部に皮下注射して、腫瘍を定着させた。2ヶ月後に解剖し、肺に転移した腫瘍塊を無菌的に摘出し、コラゲナーゼ (1 mg/m1 ; Sigma Cat. # C-9722) 溶液で処理し、細胞を分離した。この細胞 1 × 10⁶ 個を6週齢雌の無胸

腺症ヌードマウスの尾静脈から注入した。1ヶ月後再び肺に転移した腫瘍塊から前回と同様の方法で個々の腫瘍細胞を分離した。この操作をさらにもう1回繰り返し、ヒト悪性線維性組織球種M F H - A I 細胞の高肺転移性の細胞株M F H - A I - L M 細胞を分離した。

5 HSV-1又はHSV-2のICP4タンパク質に対するモノクローナル抗体 (clone No. 1101) は、Goodwin Institute for Cancer Research のものを用いた。イムノプロット分析は、文献 (Int. J. Cancer 79, 245-250, 1998) 記載の方法と同様に行った。化学ルミネッセンス (EC L ; Amersham Pharmacia Biotech 社製) は、製造者のプロトコルに従つて結合抗体を視覚化した。また、それぞれ ICP4 導入 Vero E 5 細胞又はベロ細胞に低多重度で感染させることにより生成した、HSV の ICP4 欠損変異体 d 1 2 0 (J. Virol. 56, 558-570, 1985) 及びHSV の ICP6 (ribonucleotide reductase) 欠損変異体 h r R 3 は、N. Deluca 又は S. Weller 博士 (University of Connecticut Health Center, Farmington) からそれぞれ供与されたものを用いた。

A-2 (RNAの調製とRT-PCR分析)

全RNAは Isogene RNA extraction kit (Nippon Gene 社製) を用いて培養した細胞又は組織からそれぞれ抽出し、文献 (Int. J. Cancer 79, 245-250, 1998) 記載の半定量的RT-PCR分析を行った。PCR增幅の条件としては、94°Cで40秒間変性させ、60°Cで30秒間アニーリングし、72°Cで90秒間伸長反応させるというサイクルを30回繰返し行った。ヒトカルポニンプライマーとしては、5'-gagtgtgcagacggaacttcagcc-3' [フォーワードプライマー1 (FP1) ; nt# 10-33 GenBank D17408; 配列番号6] と 5'-gtctgtgccagcttggggtc-3' [リバースプライマー1 (RP1) ; nt# 660-680; 配列番号7] を、コントロールとしてのGAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate

dehydrogenase) のプライマーとしては、5'-cccatcaccatcttcaggaa-3' [フォーワードプライマー 2 (F P 2) ; nt# 342-360 ; 配列番号 8] と 5'-ttgtcataccaggaaatgagc-3' [リバースプライマー 2 (R P 2) ; nt# 1052-1070 ; 配列番号 9] を用いて、それぞれ 671 bp と 731 bp の
5 DNA を增幅させた。

A - 3 (ヒトカルポニンプロモーターの単離)

文献 (J. Biochem. 120, 18-21, 1996) 記載の方法に従い、ヒトゲノム λ E M B L 3 ファージライブラリーのスクリーニングを行って、ヒトカルポニン遺伝子の 5' 上流側を含むゲノムクローンを単離した。 5' 側が欠失した断片である p - 1159 L u c 、 p - 385 L u c 、 p - 343 L u c 、 p - 310 L u c 、 p - 299 L u c 、 p - 288 L u c 、 p - 260 L u c 、 p - 239 L u c 、 p - 219 L u c 、 p - 201 L u c 、 p - 176 L u c 、 p - 153 L u c をゲノムクローンを鑄型にして P C R 法で増幅することにより作製した。番号は、以後 + 1 と表示される A T G 翻訳開始コドンの上流に位置する DNA 断片の 5' 末端を示している。欠失したこれらの断片は + 73 の位置に共通の 3' 末端を有している。 DQS-2000L DNA sequencer (SHIMADZU 社製) を製造者のプロトコールに従って使用し、該クローン断片のヌクレオチド配列を決定し、その配列は文献 (J. Biochem. 120, 18-21, 1996) に記載の配列 (DDBJ/GenBank™/ E M B L database ; accession No. D85611) と同一であることを確認した。文献 (Cancer Res. 61, 3969-3977, 2001) に記載の方法によって、最小の発現調節領域 (- 260 ~ + 73) を同定した。

A - 4 (トランスフェクション及びルシフェラーゼ分析)

25 トランスフェクションする 24 時間前に、あらかじめ培養した細胞を分割し、プレート上に播いた。製造者のプロトコルに従い 1 ウエル当た

り、1. 2 μ g のプロモータープラスミドと、0. 3 μ g の pCAGGS/ β -gal 関連プラスミドと、3. 75 μ l の FuGENETM 6 トランスフェクション試薬 (Roche 社製) とを 6 ウエルディッシュに注入し、細胞 (5 \times 10⁴) をトランスフェクションした。トランスフェクションの 5 24 時間後、100 μ l / ウエルの細胞溶解緩衝液 (PicaGeneTM ルシフェラーゼ分析システム、Toyo Ink 社製) 中で細胞を回収した。4 °C で 1 2000 g \times 5 分間の遠心分離を行った後、上清 (20 μ l 又は 30 μ l) をルシフェラーゼアッセイ及び β -ガラクトシダーゼアッセイにそれぞれ使用した。ルシフェラーゼ活性は BLR-201 luminescence reader 10 (Aloka 社製) を用いて測定した。 β -ガラクトシダーゼアッセイは、文献 (J. Biochem. (Tokyo) 122, 157-167, 1997) 記載の方法に準じて β ガラクトシダーゼ酵素分析システム (Promega 社製) を用いて行った。再現性を確認するため、全実験は最低三回繰り返した。細胞抽出物の β -ガラクトシダーゼ活性を測定することによりトランスフェクション効率 15 を決定し、その値に応じて、ルシフェラーゼ活性 (光ユニット) を補正した。SV40 エンハンサー及び SV40 プロモーターを含む pSV2-Luc 遺伝子の発現を比較することにより、種々の細胞株のトラン 20 スフェクション効率を評価した。データは、pSV2-Luc の値に対してノーマライズした吸光度 \pm S. E. を % として表している。

20 A-5 (ウィルスの調製)

ICP4 のコード領域を含む pGH108 (J. Virol. 56, 558-570, 1985) 由来の 4. 1 kb の平滑末端 Sal I - Mse I 断片 (Johns Hopkins School of Medicine の Hayward 博士より提供) を、pAMP1 プラスミドにクローニングした 333 bp ヒトカルボニンプロモーター 25 (-260 ~ +73) の下流の平滑末端 BamHI サイトに挿入し、及びかかるプラスミドの Smal サイトにヒト 4F2 重鎖転写エンハンサ

— (Mol. Cell Biol. 9, 2588-2597, 1989) (Harvard Medical School の Leiden 氏より提供) の 444 bp の N o t I 断片をサブクローニングした。この p A M P 1 / C A L P - I C P 4 プラスミドの 3' 側にある H i n d III サイトを平滑化し、p I R E S 2 - E G F P プラスミド (Clontech 社) を、B a m H I と A f I I I とを用いて二重消化させることにより得られた 1576 - bp 断片をサブクローニングした。この B a m H I - A f I I I 断片は、I R E S 配列 (米国特許第 4937190 号明細書) と E G F P 配列 (米国特許第 5625048 号及び第 5804387 号明細書) および S V 40 由来ポリ A シグナルから構成されている。次に、p A M P 1 / C A L P - I C P 4 - I R E S 2 - E G F P プラスミドを E c o R I と S p h I とを用いて二重消化させることにより得られた 6.7 - kb 断片を平滑化し、p K X 2 β G 3 組換えベクターの S t u I 平滑末端サイトにサブクローニングした (p K X 2 β G 3 / C A L P - I C P 4 - I R E S 2 - E G F P)。p K X 2 β G 3 組換えベクター (Connecticut 大学の Weller 氏より提供) は、I C P 6 コード配列の 2.3 - kb X h o I 断片 (p K p X 2) とその B a m H I サイトに挿入された 3.0 - kb の大腸菌 (Escharicia coli) 由来の L a c Z 配列及び p U C 19 のバックボーンからなる (J. Virol. 62, 196-205, 1988)。続いて、上記プラスミド p K X 2 β G 3 / C A L P - I C P 4 - I R E S 2 - E G F P を X h o I サイト (p K X 2 β G 3 の 5' 側 I C P 6 配列の 5' 側にある X b a I サイトと 3' 側 I C P 6 配列の 3' 側にある H i n d III サイトとともに X h o I サイトで置換したもの) で線状化し、p U C 19 配列を除去した p R R Δ - C A L P - I C P 4 - I R E S 2 - E G F P と d 120 ウィルス DNA とを、製造者のプロトコルに従って LipofectamineTM (GIBCO/BRL 社製) を使用し、6 ウエル組織培養プレート中の ICP4cDNA を導入した V e r o E 5 細胞 (2.5 \times 10⁵

／w e l l) のサブコンフルエント单層培養にコトランスフェクションした。トランスフェクション 3 時間後に 2 0 % D M E M 培養液 1 m l を添加し、9 6 時間後まで、4-hydroxymethylbenzoic acid (H M B A) 0 . 5 m g / m l を含む前記培養液 (1 0 % F B S / D M E M) で培養した。

5 プラーク形成を確認した後、H M B A を含まない 1 0 % F B S / D M E M で 2 4 時間培養した。5 0 0 μ l / ウエルのコールドウイルスバッファー (1 5 0 m M の N a C l を含む 2 0 m M の T r i s - H C l ; p H 7 . 5) に細胞を懸濁し、凍結保存した。

超音波処理 (3 0 秒間を 3 回) を組み合わせた凍結処理と解凍処理を 10 三回行い、上記懸濁液を溶解した。懸濁液を段階的に希釈し、9 6 ウエル組織培養プレートのサブコンフルエント单層培養 S K - L M S - 1 細胞に感染させた。感染後 9 6 時間 1 ウエルあたり 1 0 0 μ l の 1 1 . 3 μ g / m l のヒト I g G (Jackson ImmunoResearch Lab. 社製) を含む 1 % F B S / D M E M で培養した。プラーク形成を確認し得たウエルを蛍光 15 顕微鏡下での G F P の発現を指標にしてスクリーニングした。G F P 陽性のプラークを含むウエルの S K - L M S - 1 单層培養細胞を前記培養液 1 0 0 μ l に懸濁し、そのうちの 6 μ l を用いて、5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリル - β - D - ガラクトピラノシド (X - g a l) を基質にした β ガラクトシダーゼ酵素活性を、 β ガラクトシダーゼ酵素 20 分析システム (Promega 社製) を用いて測定した。 β ガラクトシダーゼ酵素活性陽性のウエルの S K - L M S - 1 細胞懸濁液を 5 0 0 0 回転で 5 分間遠心し、ペレットを 1 0 0 μ l / ウエルのコールドウイルスバッファーに懸濁した。9 6 ウエル組織培養プレートを用いた同様の限界希釈感染・ β ガラクトシダーゼ酵素活性測定法を V e r o E 5 細胞を用いてさらに 2 回繰り返し、組換えウィルスベクター d 1 2 · C A L P · Δ R R を单一のプラークとして精製した。ウィルス D N A を精製した後、

制限酵素 X h o I で消化し、 I C P 6 c D N A の X h o I 断片 (2. 3 - k b) をプローブにしたサザンプロット分析によりリボヌクレオチド還元酵素遺伝子座 (I C P 6 or R R - l o c u s) での組換えを確認し得た (図 1)。

5 10 ~ 20 個の 150 cm² / tissue culture flasks (IWAKI CLASS
社製) 中の E 5 細胞に感染させ、 48 時間後に剥離した細胞を回収することにより、ウィルスを調製した。4℃で 5 分間、 400 × g で遠心分離を行って細胞を収集し、 10 ml のコールドウィルスバッファー (1
10 50 mM の N a C l を含む 20 mM の T r i s - H C l ; pH 7.5)
に懸濁した。超音波処理 (30 秒間を 3 回) を組み合わせた凍結処理と解凍処理を三回行い、上記細胞を溶解した。4℃で 5 分間、 1500 × g で遠心分離を行ったあと、その上清に対してさらに 4℃で 45 分間、
15 15000 × g で遠心分離を行った。その結果得られたペレットをコールドウィルスバッファーに懸濁し、 V e r o E 5 細胞におけるプラーク
15 アッセイにより精製した d 12 · C A L P · Δ R R ウィルスベクターの
力値を決定した。

A - 6 (インビトロでの細胞崩壊分析及びウィルス複製分析)

1 % の熱不活性 F B S / P B S 中で、感染多重度 (M O I) が 0.1 ~ 0.001 p f u / c e l l で、 6 ウエル組織培養プレート中の細胞
20 のサブコンフルエント单層培養に d 12 · C A L P · Δ R R ウィルスベクターを感染させた。かかる感染細胞を 37℃で 1 時間インキュベートし、その後、 1 % の F B S と 11.3 μ g / m l のヒト I g G (Jackson
ImmunoResearch Lab. 社製) を含む前記培地で培養した。感染の 48 時間
後、プラーク / ウエルの数を計測した。ウィルス複製分析のために、 1
25 2 ウエル組織培養プレート中の S K - L M S - 1 細胞又は O S T 細胞の
单層培養 (2 × 10⁵ 細胞 / w e l l) に、 1 % の F B S / P B S 中に

て、感染多重度（M O I）が0.1となるようにd 1 2 · C A L P · Δ R R ウィルスベクターを感染させた。接種したウィルスを1時間後に取り除き、上記細胞を前記培地でインキュベートした。所定の時間（12時間、24時間、48時間）に、100μlのウィルスバッファーを用いて感染細胞をウエルから剥がした。細胞懸濁液（1μl）を10⁻³、10⁻⁴及び10⁻⁵に希釈し、その後V e r o E 5 細胞におけるウィルスの力価を決定した。

また、1%の熱不活性F B S / P B S 中で、感染多重度（M O I）が0.01/c e l l で、6ウエル組織培養プレート中のM F H - A I - L M 細胞（ヒト悪性線維性組織球種M F H - A I 細胞の高肺転移性細胞株）のサブコンフルエント単層培養にd 1 2 · C A L P · Δ R R ウィルスを感染させた。また、感染多重度（M O I）が0.1/c e l l 又は0.01/c e l l で、6ウエル組織培養プレート中のヒトG I S T 細胞及びヒト子宮筋腫培養細胞のサブコンフルエント単層培養にd 1 2 · C A L P · Δ R R ウィルスをそれぞれ感染させた。かかる感染細胞を37℃で1時間インキュベートし、その後、1%のF B Sと11.3μg/m l のヒトI g G（Jackson ImmunoResearch Lab. 社製）を含む前記培地で培養した。感染の72時間後、X - G a l 染色しpla - r - e / ウエルの数を計測した。

A - 7（インビトロでのウィルス複製の抗ヘルペスウィルス剤ガニシクロビル(ganciclovir)に対する感受性分析）

1%の熱不活性F B S / P B S 中で、感染多重度（M O I）が0.01 p f u / c e l l で、24ウエル組織培養プレート（5 × 1 0⁴ / w e l l ）または6ウエル組織培養プレート（2.5 × 1 0⁵ / w e l l ）中のS K - L M S - 1 細胞のサブコンフルエント単層培養にウィルスを感染させた。かかる感染細胞を37℃で1時間インキュベートし、その

後、1%のFBSと11.3 μg/mlのヒトIgG (Jackson ImmunoResearch Lab.社製)、種々の濃度 (0~1 μg/ml) のガンシクロビル(ganciclovir) (和光純薬社製) を含む前記培地で培養した。感染の48時間後に1ウェルあたりのplaques数を計測した。

5 ICP4発現のイムノプロット分析のため、SK-LMS-1細胞及びOST細胞に、感染多重度 (MOI) が0.01となるようにd12.CALP又はウィルスバッファーのみをそれぞれ感染させ、22時間培養したのち回収した。同量のタンパク質を9%のSDS-PAGEゲル電気泳動にかけ、ニトロセルロース膜 (Bio-Rad社製) に移した。5%のスキムミルク (DIFCO Laboratories社製) を用いて、膜を室温で2時間プロッキングし、その後、抗ICP4抗体 (希釈率1:1000) を用いて、4℃で一晩インキュベートした。

A-8 (インビボでの処理及び組織学的分析)

ヒト皮下移植腫瘍に対するd12.CALPΔRRベクターの1回静脈内投与による治療効果を検討するために、ヒト悪性線維性組織球種M-FH-AI細胞 1×10^7 個を、6週齢の雌の無胸腺症ヌードマウス (BALB/c-S1c-nu/nu) (日本SLC社製) の体側部に皮下注射して、腫瘍を定着させた。腫瘍は、ヌードマウスに移植後19日で直径6から7mm程度 ($50 \sim 70 \text{ mm}^3$) に成長した。 1×10^7 p.f.u/マウスのd12.CALPΔRRベクターを含む $100 \mu\text{l}$ のウィルス懸濁液 (n=6)、あるいは同量のウィルス緩衝液 (n=6) を、30ゲージの針を用いてそれぞれ尾静脈内に1回注入した。注入後所定の時間に腫瘍を測定し、式 [$0.53 \times \text{長さ} \times \text{幅の2乗}$] を用いて腫瘍容積を計算した。

25 また、ヒト肺転移腫瘍に対するd12.CALPΔRRベクターの静脈内投与による治療効果を検討するために、ヒト悪性線維性組織球種M

F H - A I 細胞の高肺転移性の細胞株 M F H - A I - L M 細胞 1×10^6 個を 6 週齢の雌の無胸腺症ヌードマウス (BALB/c S1c-nu/nu) (日本 SLC 社製) の尾静脈から 1 回注射して肺転移腫瘍モデルを作製した。M F H - A I - L M 細胞を静脈注射した 14 日後、組織学的研究のため、 1×10^7 p.f.u./マウスの d12. CALPΔRR ベクターを含む $100 \mu\text{l}$ のウィルス懸濁液を、30 ゲージの針を用いて 1 回静脈内投与し、その 13 日後にマウスを絶命させた。肺転組織全体並びに脳、肝臓、腎臓、心臓、小腸、子宮及び卵巣を取り出し標本とした。これら標本を、2% のパラホルムアルデヒド、0.5% のグルタルアルデヒドを用いて、1 mM の MgCl₂ を含む PBS で、4°C で 1 晚固定した。続いて、X-Gal (1 mg/ml)、5 mM の K₃Fe (CN)₆、5 mM の K₄Fe (CN)₆ 及び 1 mM の MgCl₂ を PBS 中に含む基質溶液に、該腫瘍を 37°C で 4 時間浸し、その後、3% の DMSO を含む PBS で洗浄し、X-Gal 染色を行った。また、上記肺転組織全体の標本をブアン溶液 [15% (v/v) の飽和ピクリン酸溶液、1.65% (v/v) のホルマリン、及び 1% (v/v) の酢酸/PBS] で固定し、パラフィンに包埋した。ポリ-L-リジンでコートしたマイクロスライドに、厚さ $4 \mu\text{m}$ の切片をのせ、キシレン中で処理し、段階的濃度のアルコール溶液で脱水した。その後、Hematoxylin-Eosin 染色を行い、d12. CALPΔRR による腫瘍組織の破壊を倒立型顕微鏡 (オリンパス BX-50) を用いて観察した。

次に、M F H - A I - L M 細胞 1×10^6 個又は 5×10^5 個を 6 週齢の雌の無胸腺症ヌードマウス (BALB/c S1c-nu/nu) (日本 SLC 社製) の尾静脈から注射して肺転移腫瘍モデルを作製した。M F H - A I - L M 細胞を静脈注射した 17 日目、27 日目及び 34 日目に、 1×10^7 p.f.u./マウスの d12. CALPΔRR ベクターを含

む 50 μ l のウィルス懸濁液を、30ゲージの針を用いて3回静脈内投与し、13日後にマウスを絶命させた。肺転組織全体を取り出し、2%のパラホルムアルデヒド、0.5%のグルタルアルデヒドを用いて、1 mMのMgCl₂を含むPBSで、4°Cで1晩固定し、ヒト肺転移腫瘍に対するd12. CALPΔRRベクターの静脈内投与による治療効果を調べた。

A-9 (統計学的分析)

無対のStudent's t-testを使って、統計的差異を確認した。差異はp<0.05で、統計的に有意であると考えられた。

10 実施例B [結果]

B-1 (カルポニン陽性細胞における組換えHSVベクターのインビトロでの選択的複製)

カルポニン陽性細胞及び増殖細胞中で選択的に複製するHSVベクターを構築するため、4F2エンハンサー/-260カルポニンプロモーター/ICP4/IRES-EGFPを含むDNA断片を、ICP4-HSV変異体d120 (J. Virol. 56, 558-570, 1985) のRR(ICP6)遺伝子座 (U₁36) に相同組み換え法を用いて挿入し、d12. CALPΔRRベクターを作製した。d12. CALPΔRRベクターは、ICP6プロモーターの制御下にβ-ガラクトシダーゼを発現し、カルポニンプロモーターの制御下にICP4タンパク質とEGFPたんぱく質を発現させることが可能である(図1)。カルポニン発現ヒト平滑筋肉腫細胞株 (SK-LMS-1) とカルポニン非発現ヒト骨肉腫細胞株 (O-ST) を使用して、d12. CALPΔRRベクターのウィルス複製の細胞選択性を評価した。

25 ウィルス力値を感染多重度0.1 (2×10⁵ cells/well) のシングルステップグロースアッセイで評価した。d12. CALPΔ

R R ベクターは、カルポニン陽性 SK - L M S - 1 細胞中で複製したが、
d 1 2 . C A L P Δ R R の力価は感染の 7 2 時間後のカルポニン陰性 O
S T 細胞中では SK - L M S - 1 細胞に比べて $1 / 10^5$ 程度に減少し
た（図 2）。両細胞の増殖速度は同程度であった。感染 2 2 時間後の細胞
5 抽出物のイムノプロット分析を行った結果、SK - L M S - 1 細胞では
I C P 4 タンパク質が発現しているが、O S T 細胞では I C P 4 タンパ
ク質が発現していないことがわかった。これはウィルス複製分析結果と
一致していた。これに対し、相同組み換えの親株である d 1 2 0 ウィル
スベクターは、SK - L M S - 1 及び O S T の培養物において子孫ウィ
10 ルスの產生はまったく見られなかった。

6 ウェルディッシュ中の SK - L M S - 1 細胞に d 1 2 . C A L P Δ
R R ベクターを感染させ、感染の 9 6 時間後に、X - g a 1 アガロース
オーバーレイで β - ガラクトシダーゼ発現細胞を青色に染色し、同時に
倒立型蛍光顕微鏡で、E G F P の発現を検証した。崩壊し死滅しつつあ
る腫瘍細胞に β - ガラクトシダーゼが発現し、その周囲の生細胞に E G
15 F P が発現していることが確認できた（図 3）。

1 個の細胞に、両者の発現が同時に存在する例も多数観察された。

B - 2 (組換え H S V - 1 ベクターの抗ヘルペスウィルス剤ガンシクロ
ビル(ganciclovir)に対する感受性)

20 d 1 2 . C A L P Δ R R ベクターをヒト悪性腫瘍の治療に応用する場
合、最も重要な特性は、T K 遺伝子をインタクトな状態でもつため、抗
ヘルペスウィルス剤であるガンシクロビル(ganciclovir)に感受性を示
すことである。2 4 ウェル (5×10^4 / well) ディッシュ中の S
K - L M S - 1 細胞に、種々の濃度 (0 ~ 1 0 0 n g / m l) のガンシ
25 クロビル(ganciclovir)存在下で、d 1 2 . C A L P Δ R R を多重感染度
0 . 0 1 で感染させ、感染の 4 8 時間後に、X - g a 1 を基質にして染

色し、1ウェルあたりの β -ガラクトシダーゼ陽性のplaques数を計測した。また、6ウェルディッシュ中のVero E 5細胞(2.5×10^5 /well)に $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のガンシクロビル(ganciclovir)存在下と非存在下で、d 12. CALPΔRRベクターを感染させ、感染の48時間後に、X-galを基質にして染色した(図4)。

SK-LMS-1細胞、ICP4cDNAを導入したVero E 5細胞共に、ガンシクロビル(ganciclovir)の存在下でd 12. CALPΔRRベクターの複製が抑制された。SK-LMS-1細胞では、 $40 \text{ng}/\text{ml}$ のガンシクロビル(ganciclovir)存在下で完全に抑制された。d 12. CALPΔRRベクターは、野性型ウイルスよりも同薬剤に感受性が高いことが報告されている(Cancer Res. 54, 3963-3966, 2001)複製可能型HSV-1変異体h rr 3と同等のガンシクロビル(ganciclovir)に対する感受性を示した。この結果は、d 12. CALPΔRRベクターが治療後にガンシクロビル(ganciclovir)またはアシクロビル(aciclovir)でウイルス感染細胞を除去できる安全策を備えていることを示している。

B-3 (インビオでの処理及び組織学的分析)

MFH-AI-LM細胞株がカルポニンのmRNAを発現しているかどうかを、MFH-AI-LM細胞株の全RNAを対象とするRT-PCR分析により調べたところ、MFH-AI-LM細胞株がカルポニンのmRNAを発現していることが確認された(図5a)。また、上記MFH-AI-LM細胞株に、感染多重度0.01のd 12. CALPΔRRベクターを72時間感染させた。ベクターの複製は、X-Gal染色しplaques形成を指標として評価した(図5b)。その結果、d 12. CALPΔRRベクターはMFH-AI-LM細胞内で複製され、MFH-AI-LM細胞に対して細胞溶解活性を示すことが確認された。さらに、GIST細胞及び子宮筋腫培養細胞に、感染多重度0.01又は0.

1 の d 1 2 . C A L P Δ R R ベクターをそれぞれ 7 2 時間感染させた。ベクターの複製は、 X - G a 1 染色し プラーク形成を指標として評価した(図 6)。その結果、 d 1 2 . C A L P Δ R R ベクターは G I S T 細胞(6 図 a, b) 及び子宮筋腫培養細胞(6 図 c, d) 内で複製され、 0 . 5 0 1 M O I (6 図 a, c) 及び 0 . 1 M O I (6 図 b, d) の結果から投与量に依存して細胞溶解活性を示すことが確認され、特に、 0 . 1 M O I (6 図 b, d) の投与では視野中のすべての腫瘍細胞への d 1 2 . C A L P Δ R R ベクターの感染が認められた。

10 M F H - A I 細胞により定着した皮下腫瘍に対する d 1 2 . C A L P Δ R R ベクターのインビボでの抗腫瘍効果を調べた。 M F H - A I - L M 細胞株の皮下移植腫瘍に対する d 1 2 . C A L P Δ R R ベクターの 1 回静脈内投与による治療効果を経時変化として表した(図 7)。 0 日に 1×10^7 p f u / マウスの d 1 2 . C A L P Δ R R を尾静脈から注入した。静脈注射後 2 9 日目の治療(d 1 2 . C A L P Δ R R 投与)群と未治療(P B S 投与)群の腫瘍体積(m e a n \pm S. E., n = 6)は、それぞれ $500 \pm 136 \text{ mm}^3$ と $183 \pm 33 \text{ mm}^3$ であった。治療群は未治療群に比べて有意な抗腫瘍効果を示した。

20 ヒト肺転移腫瘍に対する d 1 2 . C A L P Δ R R の静脈内投与によるインビボでの治療効果を調べた(図 8)。ヒト悪性線維性組織球種 M F H - A I 細胞の高肺転移性株 M F H - A I - L M 細胞を用いた肺転移腫瘍モデルマウスの尾静脈から、 1×10^7 p f u / マウスの d 1 2 . C A L P Δ R R ベクターを注入後 1 3 日目の肺転移腫瘍(図 8 a, b) 及び正常組織である脳(図 8 c)、心臓(図 8 d)、肝臓(図 8 e)の X - G a 1 染色、並びに、 Hematoxylin-Eosin 染色による肺転移腫瘍の組織学的解析(図 8 f, g)を行った。 d 1 2 . C A L P Δ R R の 1 回静脈内投与によって、肺転移巣に d 1 2 . C A L P Δ R R ベクターの複製を示

す X - G a 1 染色と組織学的に腫瘍の壊死が認められたが、脳、心臓、肝臓などの正常組織ではベクターの感染と複製を示す X - G a 1 染色は認められなかった。

次に、M F H - A I - L M 細胞の投与細胞数を 1×10^6 個又は 5×10^5 個とし、M F H - A I - L M 細胞の投与後 17 日目、27 日目及び 34 日目に 1×10^7 p f u / マウスの d 12. C A L P A R R ベクターを計 3 回静脈内投与した場合のヒト肺転移腫瘍の治療効果を調べた(図 9)。M F H - A I - L M 腫瘍細胞 1×10^6 個又は 5×10^5 個を尾静脈から注射して作製した肺転移腫瘍モデルのいずれに対しても、d 12. C A L P A R R ベクター投与の治療群の肺転移腫瘍抑制効果は明らかであった。また、Hematoxylin-Eosin 染色による組織学的解析によつても治療群での転移抑制効果が確認された。

産業上の利用可能性

間葉系細胞由来の悪性腫瘍すなわち肉腫は、化学療法や放射線療法に抵抗性で、外科的切除後も再発を繰り返し、最終的には肺、肝、腹膜などに転移し予後が悪い。わが国における症例数は、消化器外科領域のストローマ腫瘍(G I S T)、整形外科領域の骨・軟部肉腫を中心に婦人科領域の平滑筋肉腫、胸部・消化器外科領域の悪性中皮腫、脳外科領域の纖維肉腫、悪性髄膜腫、悪性神経鞘腫等を合わせて年間 5000 例前後の初発例がある。全がんのおよそ 1 ~ 2 % と少ないものの、若年者にも多発し化学療法に感受性のある一部の症例を除いては有効な治療法がないことから、新治療法の開発を切望する社会的要請が強い。肉腫の病因、病態に関連する遺伝子解析は、骨肉腫や平滑筋肉腫で p 53 と R b 遺伝子、G I S T で K I T 遺伝子の変異、E w i n g 肉腫や滑膜肉腫、脂肪肉腫で融合遺伝子の存在が報告されているが、まだ治療に応用できる段

階はない。また、これまでの動物実験で、p53やサイトカイン、自殺遺伝子である単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(HSV-tk)などを種々のベクターを用いて肉腫細胞に直接導入する方法が試みられたが、十分な治療効果が得られていない。

5 遺伝子治療は、がん細胞に導入する遺伝子の細胞選択性的な作用や発現プロモーターの活性、ウイルスベクターの感染導入など、いろいろなレベルでがん細胞選択性を高めることが可能であり、肉腫に対しても有望な治療法として注目されている。実際、オステオカルシンのプロモーターを用いてHSV-tkを複製能力のないアデノウイルスベクターで骨
10 肉腫選択性に発現させることにより、静脈内投与でも肺転移巣を有意に抑制し得ることが報告された(Cancer Gene Ther. 5, 274-280, 1998)。しかし、オステオカルシンは分化段階にある正常な骨芽細胞にも発現しているので、導入遺伝子の発現を制御するだけでは、がん細胞選択性を高めるには不十分である。加えて、分化のマーカー遺伝子のプロモーター
15 によって細胞選択性を高めることは、一方でベクターの汎用性を低下させることであり、多種多様な組織、細胞に由来し、それぞれの症例数が限られている肉腫の場合、ベクター開発の費用対効果の面で不利である。

さらに、これまでの肉腫に対する実験的遺伝子治療に用いられた複製能力を欠如したウイルスベクターやリポソームベクターでは、すべてのがん細胞に治療遺伝子を導入することは不可能である。したがって、動物実験で延命効果は得られるものの持続的な抗腫瘍効果は期待できない。また、がん細胞への遺伝子導入効率が低ければ、それだけ大量のウイルスベクターが必要であり、過剰な免疫反応やアレルギー反応が起きる危
25 險性も高まる。

難治性肉腫の治療には、何か従来の方法とは異なる全く新しいアプロ

ーチが必要であると考えられてきたが、その手がかりは得られていなかった。本発明の実施例はかかる要望等に応えうるものであり、本発明によると、肉腫に限らず悪性腫瘍等の特定の細胞で複製し腫瘍細胞を破壊しつつ特異的に治療遺伝子を発現する、正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを提供することができる。治療終了後に薬剤でウイルスの複製を停止させることができる安全策を備えたかかる細胞特異的発現複製ベクターを用いることにより、世界で最初のヒトを対象にした細胞選択的な発現複製ベクターを用いた遺伝子治療が可能となる。

カルポニン遺伝子は成体では主として平滑筋細胞に発現しており、特に血管平滑筋細胞の増殖は、腫瘍血管新生やステント留置後の血管狭窄、糖尿病性網膜症などの増殖性血管病変の原因であるため、本発明によつて提供されるカルポニンプロモーターをもつ平滑筋細胞特異的発現複製ベクターで、増殖する平滑筋細胞を選択的に破壊することにより、これらの疾患をも治療することが可能である。中でも、本発明によってはじめて可能となる腫瘍血管平滑筋を選択的に破壊する治療法は、すべての固形癌に有効ながん治療法として、画期的な効果をもたらす可能性がある。さらに、カルポニンを発現するメサンギウム細胞の増殖によっておこる増殖性糸球体腎炎や、カルポニンを発現する筋線維芽細胞の増殖によっておこる肺や肝臓などの線維症に対する治療剤としても有効に作用し得るものである。

請 求 の 範 囲

1. 細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域を所定の遺伝子の上流に組み込んだ成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターにおいて、前記細胞特異的発現複製ベクターに存在するチミジンキナーゼ (Thymidine kinase) 遺伝子を利用して所望の時期にその複製を抑制しうることを特徴とする成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。
5
2. 細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域が、配列番号 1 に示される塩基配列を含む領域であることを特徴とする請求項 1 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。
10
3. 配列番号 1 に示される塩基配列を含む領域が、配列番号 2 に示される塩基配列からなるヒトカルポニン遺伝子プロモーターを含む領域であることを特徴とする請求項 2 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。
15
4. 配列番号 2 に示される塩基配列を含む領域が、配列番号 3 に示される塩基配列を含む領域であることを特徴とする請求項 3 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。
5. 細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域が、配列番号 1 、
20 配列番号 2 又は配列番号 3 に示される塩基配列において、1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ転写開始制御活性を有する塩基配列を含む領域であることを特徴とする請求項 1 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。
6. 転写開始制御領域の上流にエンハンサーが組み込まれていることを
25 特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。

7. エンハンサーが 4 F 2 エンハンサーであることを特徴とする請求項
6 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。

8. 所定の遺伝子のさらに下流に、所定の遺伝子とは異なる目的タンパ
ク質をコードするDNAが連結され、前記転写開始制御領域の制御下に
5 目的タンパク質を発現することを特徴とする請求項 1～7 のいずれか記
載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。

9. 目的タンパク質をコードするDNAが、I R E S (internal
ribosomal entry site)を介して所定の遺伝子に連結されていることを特
徴とする請求項 8 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製
10 ベクター。

10. 目的タンパク質をコードするDNAが、アポトーシス促進関連遺
伝子であることを特徴とする請求項 1～9 のいずれか記載の成体正常細
胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。

11. 目的タンパク質をコードするDNAが、血管新生抑制作用をもつ
15 タンパク質をコードするDNAであることを特徴とする請求項 1～9 の
いずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。

12. 目的タンパク質をコードするDNAが、癌転移抑制作用をもつタ
ンパク質をコードするDNAであることを特徴とする請求項 1～9 のい
ずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。

20 13. 目的タンパク質をコードするDNAが、癌抑制作用をもつタンパ
ク質をコードするDNAであることを特徴とする請求項 1～9 のいずれ
か記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。

14. 所定の遺伝子が、ウイルス複製関連遺伝子であることを特徴とす
る請求項 1～13 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異
25 的発現複製ベクター。

15. ウイルス複製関連遺伝子が、I C P 4 又は E 1 A であることを特

徴とする請求項 1 4 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。

1 6. 発現複製ベクターが、ウイルスベクターであることを特徴とする請求項 1 ～ 1 5 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的 5 発現複製ベクター。

1 7. ウイルスベクターが、単純ヘルペスウイルスベクター (H S V ベクター) 又はアデノウイルスベクターであることを特徴とする請求項 1 6 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。

1 8. 腫瘍細胞特異的、腫瘍新生血管の増殖平滑筋特異的、増殖性血管 10 病変における増殖平滑筋特異的、糸球体腎炎における増殖メサンギウム 細胞特異的、又は線維症における増殖筋線維芽細胞特異的な発現複製ベクターであることを特徴とする請求項 1 ～ 1 7 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。

1 9. リボヌクレオチドリダクターゼ (Ribonucleotide reductase) を 15 コードする D N A を欠失していることを特徴とする請求項 1 ～ 1 8 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。

2 0. 請求項 1 ～ 1 9 のいずれかに記載の成体正常細胞に作用しない細 20 胞特異的発現複製ベクターを、生体細胞組織に導入し、発現複製させることを特徴とする成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの遺伝子、タンパク質又はペプチドの発現複製方法。

2 1. 請求項 1 ～ 1 9 のいずれかに記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、生体細胞組織に導入し、発現複製させ、その後の所望の時期に、細胞特異的発現複製ベクターの発現複製を抑制することを特徴とする成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベ 25 クターの遺伝子、タンパク質又はペプチドの発現複製・抑制方法。

2 2. 細胞特異的発現複製ベクターの発現複製の抑制が、アシクロビル

(aciclovir)、ガンシクロビル (ganciclovir) 等の抗ウイルス薬を用いることによる抑制であることを特徴とする請求項 21 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの遺伝子、タンパク質又はペプチドの発現複製・抑制方法。

5 23. 請求項 1～19 のいずれかに記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、生体細胞組織に導入し、発現複製させて前記細胞特異的発現複製ベクターによるチミジンキナーゼ活性を測定することを特徴とする成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの生体内分布を検出する方法。

10 24. チミジンキナーゼ活性の測定が、¹²⁴I でラベルしたウラシル誘導体 FIAU を用いる Positron Emission Tomography による測定であることを特徴とする請求項 23 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの生体内分布を検出する方法。

25. 生体細胞組織が、腫瘍組織、血管またはリンパ管狭窄組織、腎炎
15 組織又は線維症組織であることを特徴とする請求項 20～24 のいずれか記載の方法。

26. 請求項 1～19 のいずれかに記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを含むことを特徴とする治療薬。

27. 悪性腫瘍、線維症、増殖性血管病変又は増殖性糸球体腎炎に対する治療薬であることを特徴とする請求項 26 記載の治療薬。

20 28. 悪性線維性組織球種、消化管ストローマ腫瘍又は子宮筋腫に対する治療薬であることを特徴とする請求項 27 記載の治療薬。

29. 請求項 1～19 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞
25 特異的発現複製ベクターを、肺、肝臓などの線維症組織又は乳がん、胃がん、膵臓がんなどの悪性腫瘍組織に導入し、ベクターの複製と遺伝子、蛋白およびペプチドの発現によって、増殖筋線維芽細胞を選択的に破壊

することを特徴とする線維症及び悪性腫瘍の治療方法。

30. 悪性線維性組織球種、消化管ストローマ腫瘍又は子宮筋腫を対象とすることを特徴とする請求項29記載の線維症及び悪性腫瘍の治療方法。

5 31. 請求項1～19のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、血管またはリンパ管の狭窄組織あるいは動脈硬化組織、糖尿病性網膜症組織に導入し、ベクターの複製と遺伝子、タンパク質又はペプチドの発現によって、増殖平滑筋細胞又は血管周細胞を選択的に破壊することを特徴とする増殖性血管病変の治療方法。

10 32. 請求項1～19のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、腎炎組織に導入し、ベクターの複製と遺伝子、タンパク質又はペプチドを発現させ、増殖メサンギウム細胞を選択的に破壊することを特徴とする増殖性糸球体腎炎の治療方法。

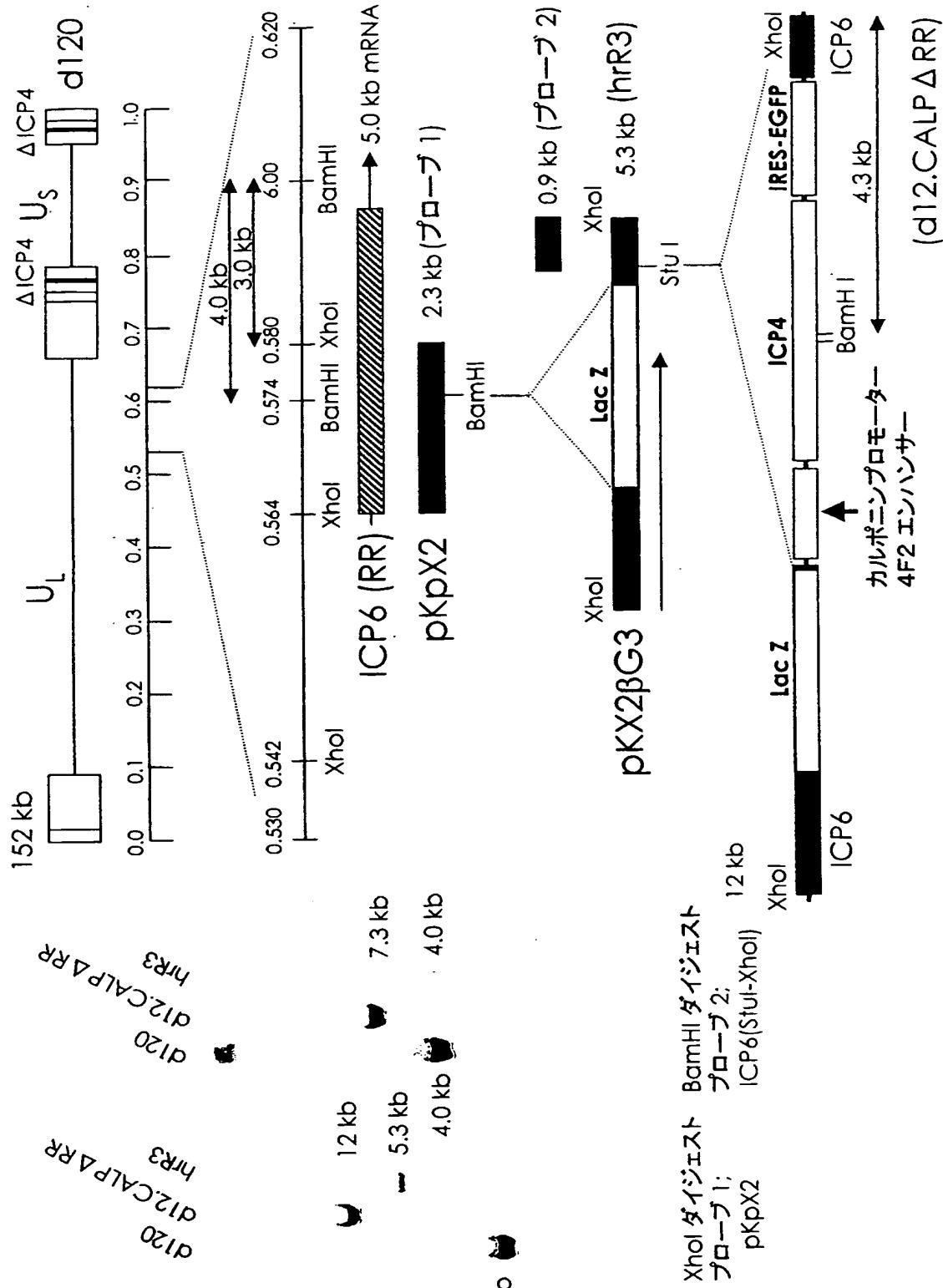
15 33. 細胞特異的発現複製ベクターを、静脈又は動脈に投与することを特徴とする請求項29～32のいずれか記載の治療方法。

34. 所望の時期に、細胞特異的発現複製ベクターの発現複製を抑制することを特徴とする請求項29～33のいずれか記載の治療方法。

35. 細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域が活性化され得る細胞又は該遺伝子を発現する細胞に、請求項1～19のいずれか記載の細胞特異的発現複製ベクターを含む相同組み換え後のウイルス混合液を感染させ、ベクター内に組み込んだ遺伝子の発現を指標にして、アガロースゲルオーバーレイ法を用いず、限界希釈法によって單一クローンにまで精製することを特徴とする細胞特異的発現複製ベクターの製造方法。

25 36. 細胞が、ICP4(−)細胞であることを特徴とする請求項35記載の細胞特異的発現複製ベクターの製造方法。

第 1 回

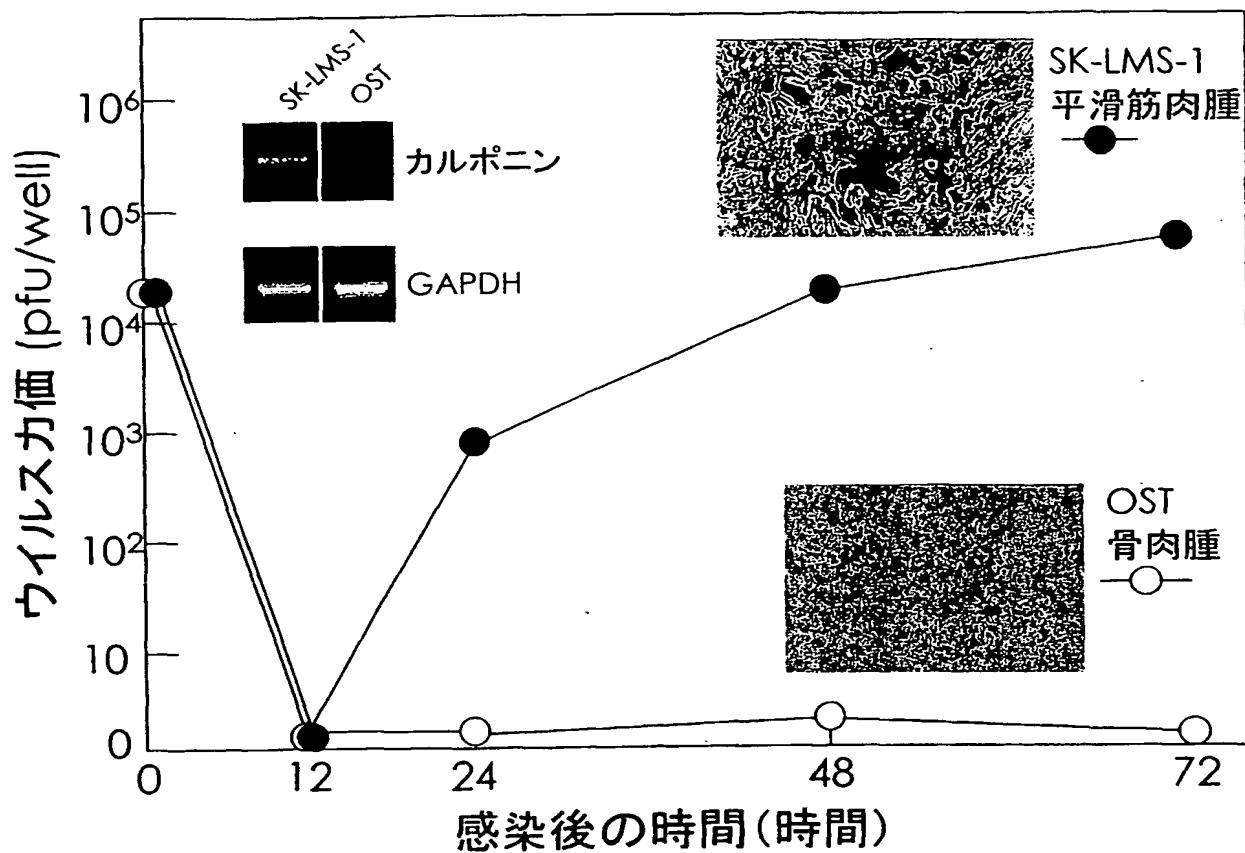


BEST AVAILABLE COPIES

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第 2 図

シングルステップグロースアッセイ



BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第 3 図

SK-LMS-1 平滑筋肉腫



オリジナル倍率 x 20

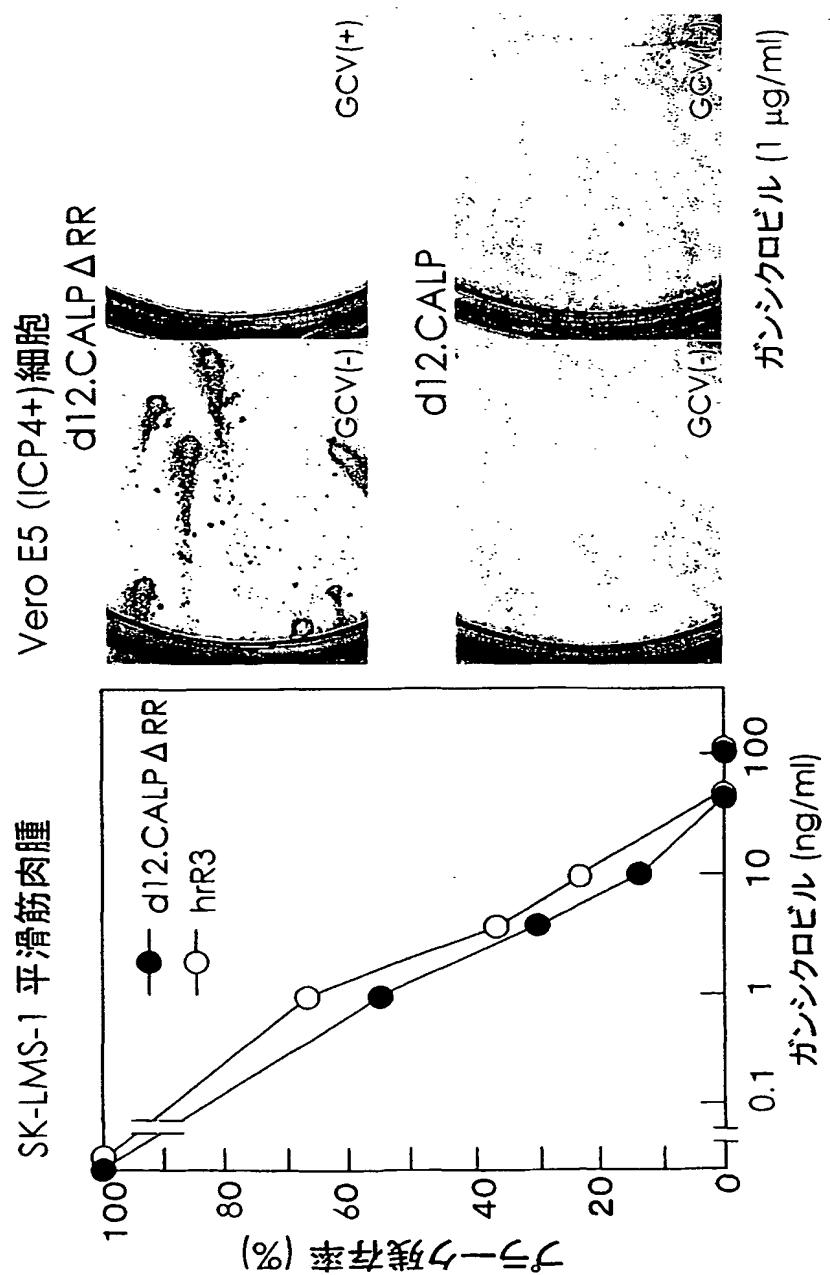


オリジナル倍率 x 10

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

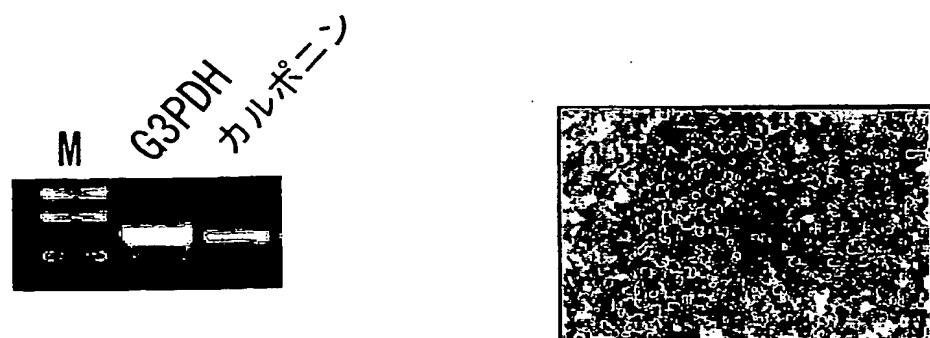
第 4 図



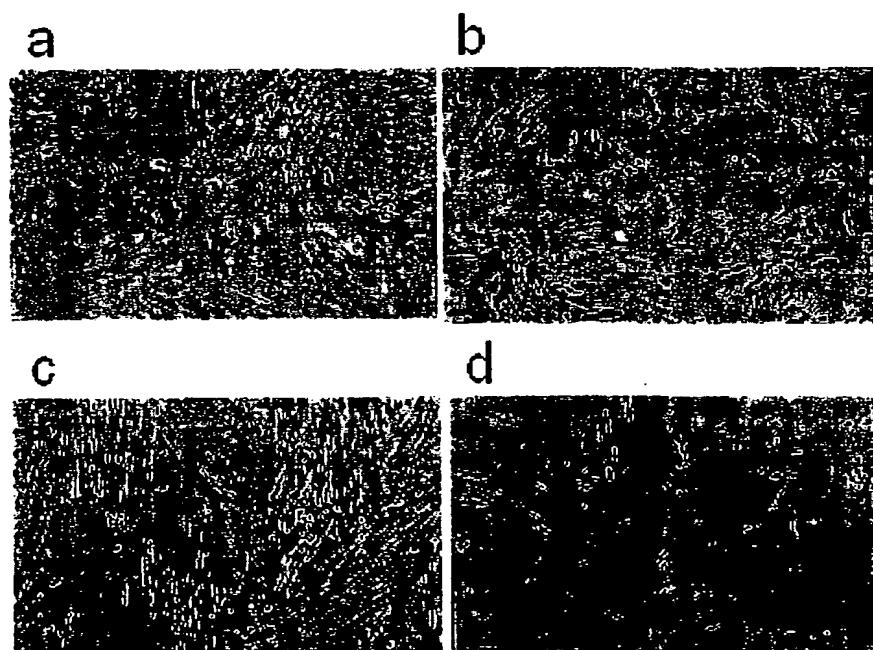
BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第 5 図



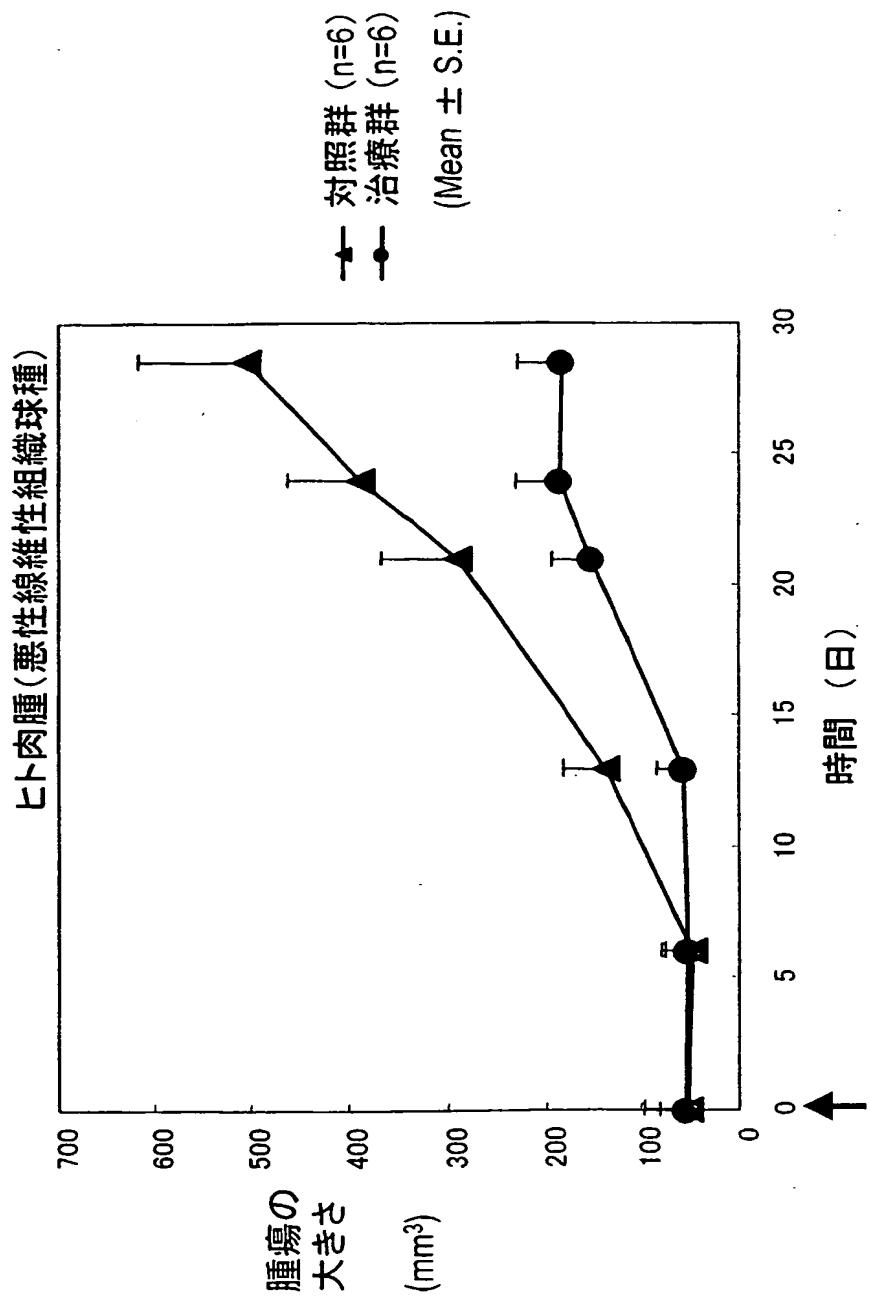
第 6 図



BEST AVAILABLE COPY

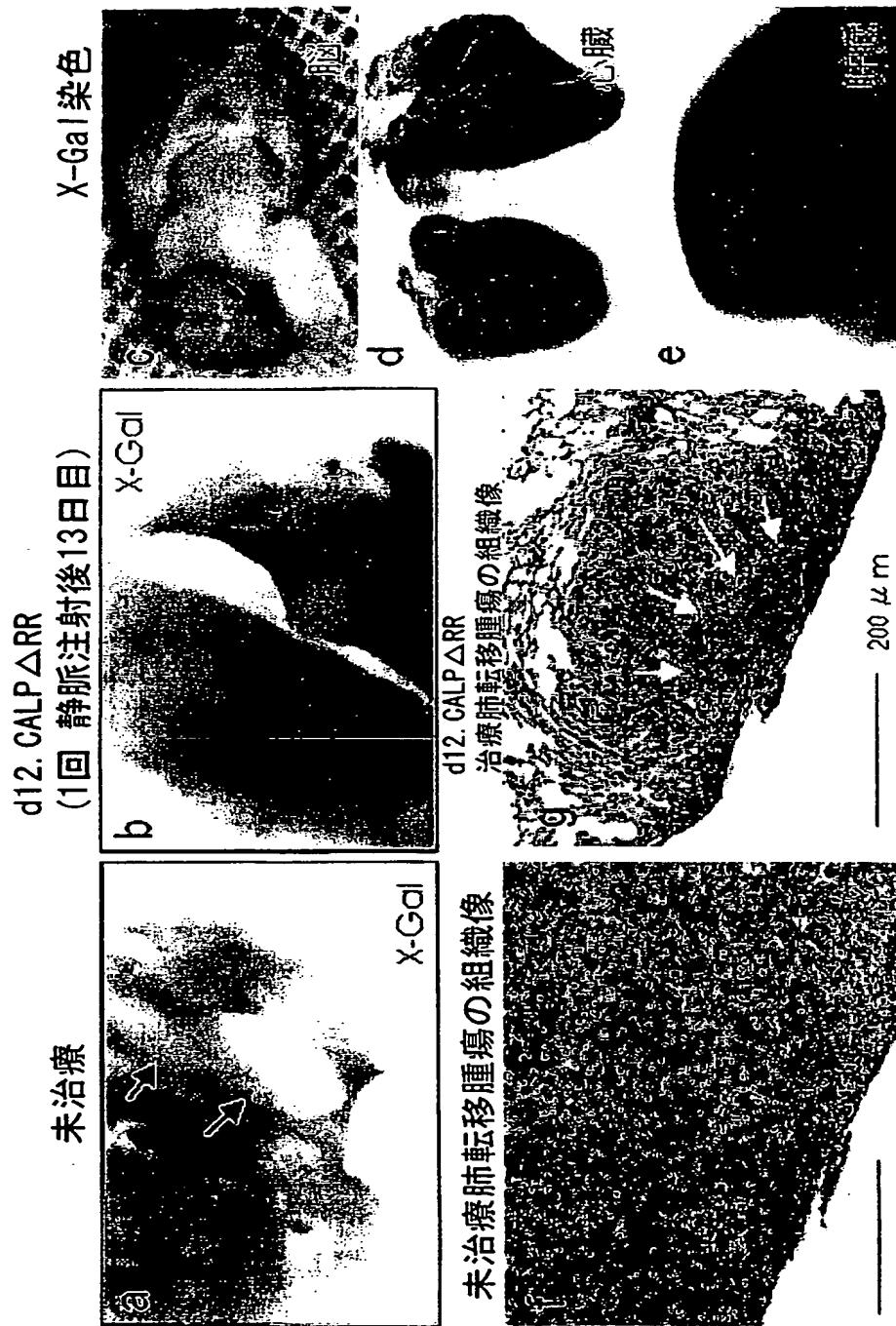
THIS PAGE BLANK (USPTO)

第 7 図



THIS PAGE BLANK (USPTO)

第 8 図



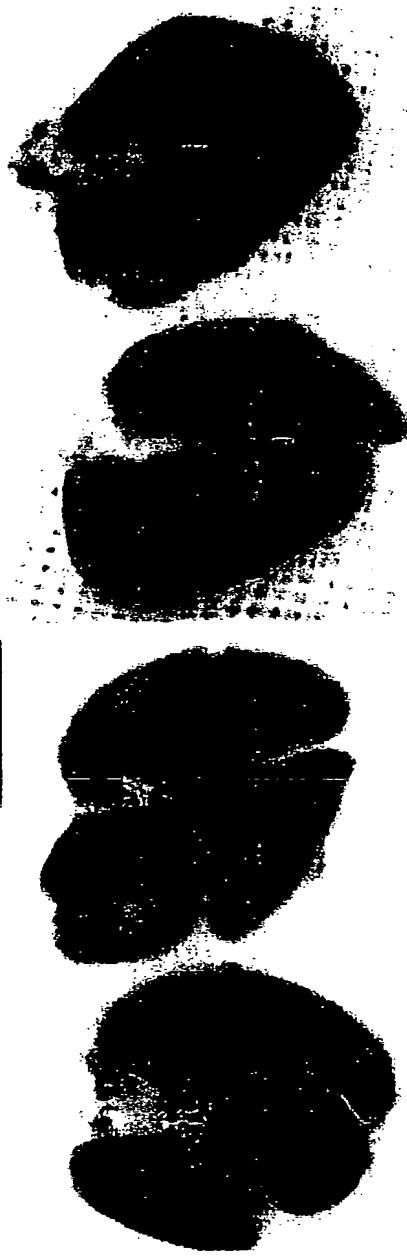
BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第 9 図

静脈内接種細胞数 1×10^6

 静脈内接種細胞数 5×10^5



未治療
d12. CALP△RR
(3回静脈注射)

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION

<120> Cell specific express replication vector

<130> B08-01PCT

<140>

<141>

<150> JP P2001-402102

<151> 2001-12-28

<150> JP P2002-255395

<151> 2002-08-30

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 41

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gaaacaatga cacaatcagc tcccaatacc aaggccctga c

41

<210> 2

<211> 260

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

gaaacaatcga cacaatcagc tcccaatacc aagggcciga calcacaagg ggagggaaag 60
gcagctgagg tlglgggggg agglgccccg ccccttggca ggcccttaca gccaatgaa 120
cggcccctgga agagacccgg gtgccttcgg gagcttcaaa aacatgtgag gagggaaagag 180
tgtgcagacg gaacttcagc cgctggctct gtctcagcgc tca gtcgcgc cactggcccc 240
gccagagccc accggccagc 260

<210> 3

〈211〉 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

220

<223> Description of Artificial Sequence: Region consists of human calponin gene promoter and its structural gene fragment

<400> 3

<210> 4

211 445

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

gtagatggat cccatggatcc 60
ccatggatcc gatggatccat 120
atccatggatccatggatcc 180
atccatggatccatggatcc 240

<210> 5
<211> 455
<212> DNA
<213> *Homo sapiens*

```

<400> 5
ggatccatcg tcccatcaga gctaaaagcc ccaggaggag agggggcgtg gtttgtcccc 60
acaaacccctt gggatccccg gcctcccccgc cccttgcctt tctctccagc cagactctat 120
tgaaccccccc ctcttcctaa actcgcccccc agagaacagt gaagtaggag cagccgtaaag 180
tccgggcagg gtcctgtcca taaaaggctt tccccggccc ggctcccgcc cggcagcgtg 240
ccccgcggccg gcccgcctca tcctccaaagc atgcagagaa tgcctcggca gccccggtag 300
actgcctccaa ctgggtgtct tcccccaat atggagccgtg tggtggatca ctgggggagc 360
cggggggggg gagcggagcc ggcttccctt agcagggagg gggccgagga gcgagccagt 420
ggggggaggctt gacatcacca cggcggcagc ccctt 455

```

<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:FP1

<400> 6
gagtgatgcag acggaacttc agcc 24

<210> 7

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:RP1

<400> 7

gtcttgcc aacttgggt c

21

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:FP2

<400> 8

cccatcacca tcttccagga

20

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:RP2

<400> 9

ttgtcataacc aggaaatgag c

21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/13683

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/64, C12P21/00, C12Q1/02, A61K48/00, A61P35/00,
43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/64, C12P21/00, C12Q1/02, A61K48/00, A61P35/00,
43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Cheon J. et al., Adenovirus-mediated suicide-gene therapy using the herpes simplex virus thymidine kinase gene in cell and animal models of human prostate cancer: changes in tumour cell proliferative activity. BJU Int. 2000 Apr., Vol.85, No.6, pages 759 to 766	1-28,35-36
A	TAKAHASHI K. et al., Transcriptional Targeting of Replication-Competent Herpes Simplex Virus to Proliferating Smooth Muscle Cells. Circulation 2000 Oct., Vol.102, No.18, II-86, 416	1-28,35-36
A	TAKAHASHI K. et al., The 5'-flanking region of the human smooth muscle cell calponin gene contains a cis-acting domain for interaction with a methylated DNA-binding transcription repressor. J.Biochem. (Tokyo), 1996 Jul., Vol.120, No.1, pages 18 to 21	1-28,35-36

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
17 March, 2003 (17.03.03)

Date of mailing of the international search report
08 April, 2003 (08.04.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Faxsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/13683

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YAMAMURA H. et al., "Identification of the transcriptional regulatory sequences of human calponin promoter and their use in targeting a conditionally replicating herpes vector to malignant human soft tissue and bone tumors.", Cancer Res. 15 May, 2001 (15.05.01), Vol.61, No.10, p.3969-77	1-28,35-36
A	WO 02/092816 A1 (Japan Science and Technology Corp.), 21 November, 2002 (21.11.02), & JP 2002-335965 A	1-28,35-36
P,A	Kruger M. et al., Involvement of proteasome alpha-subunit PSMA7 in hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation. Mol.Cell.Biol. 2001 Dec., Vol.21, No.24, pages 8357 to 8364	1-28,35-36

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/13683

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 29-34

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 29 to 34 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N15/64, C12P21/00, C12Q1/02, A61K48/00,
A61P35/00, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N15/64, C12P21/00, C12Q1/02, A61K48/00,
A61P35/00, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GenSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GenSeq,
BIOSIS/WPI(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Cheon J. et al., Adenovirus-mediated suicide-gene therapy using the herpes simplex virus thymidine kinase gene in cell and animal models of human prostate cancer: changes in tumour cell proliferative activity. BJU Int 2000 Apr, Vol. 85, No. 6, p. 759-766	1-28, 35-36
A	Takahashi K. et al., Transcriptional Targeting of Replication-Competent Herpes Simplex Virus to Proliferating Smooth Muscle Cells. Circulation 2000 Oct, Vol. 102, No. 18, II-86, 416	1-28, 35-36

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 03. 03

国際調査報告の発送日

08.04.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本間 夏子



4 N

9637

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	Takahashi K et al., The 5'-flanking region of the human smooth muscle cell calponin gene contains a cis-acting domain for interaction with a methylated DNA-binding transcription repressor. <i>J Biochem (Tokyo)</i> 1996 Jul, Vol. 120, No. 1, p. 18-21	1-28, 35-36
A	Yamamura H. et al., 'Identification of the transcriptional regulatory sequences of human calponin promoter and their use in targeting a conditionally replicating herpes vector to malignant human soft tissue and bone tumors.', <i>Cancer Res.</i> 2001 May 15, Vol. 61, No. 10, p. 3969-77	1-28, 35-36
A	WO 02/092816 A1 (科学技術振興事業団) 2002. 11. 21 & JP 2002-335965 A	1-28, 35-36
PA	Kruger M. et al., Involvement of proteasome alpha-subunit PSMA7 in hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation. <i>Mol Cell Biol</i> 2001 Dec, Vol. 21, No. 24, p. 8357-8364	1-28, 35-36

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 29-34 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲 29-34 は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a) (i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の單一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

THIS PAGE BLANK (USPTO)